

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОБУСЛОВЛЕННЫХ ВОЗРАСТОМ
ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА
СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ВИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ
ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ**

© 2021 г. В. Б. Вайс¹, И. М. Вангели¹, Ч. М. Эльдаров¹, Л. Е. Бакеева^{1, *}

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

*E-mail: bakeeva@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 28.01.2021 г.

После доработки 23.03.2021 г.

Принята к публикации 24.03.2021 г.

Методами электронной микроскопии и морфометрии проведен сравнительный анализ возрастных изменений ультраструктуры митохондриального аппарата скелетной мышцы у представителей видов с различной программой старения: короткоживущих, хорошо изученных классических видов – мыши (C57BL/6), крысы Вистар; преждевременно стареющих крыс OXYS; а также животных с замедленным старением – голый землекоп (*Heterocephalus glaber*). Показано, что у мышей обусловленные возрастом преобразования общей организации митохондриального аппарата скелетной мышцы соответствуют изученным ранее для крыс Вистар: митохондриальный ретикулум формируется к 2.5–3-месячному возрасту, к 30-месячному возрасту происходит значительная редукция митохондриального аппарата, в результате снижения числа митохондрий, количество сечений митохондрий в мышечном волокне снижается почти в 2 раза – с 0.45 ± 0.07 до 0.23 ± 0.02 шт на $\mu\text{м}^2$. Деструктивные изменения ультраструктуры митохондрий не обнаружены, в отличие от крыс OXYS, у которых возрастные изменения хондриома затрагивают как общую структуру митохондриального аппарата мышечных волокон, так и внутреннюю ультраструктуру органелл. В то же время у схожего с мышами по размеру мелкого грызуна *Heterocephalus glaber* к пятилетнему возрасту количество и размер митохондрий в скелетной мышце значительно возрастает, однако митохондриальный ретикулум не формируется. Предполагается, что особая организация митохондриального аппарата скелетной мышцы голого землекопа обеспечивает необходимый уровень окислительно-восстановительных процессов в мышцах, предупреждая снижение работоспособности и развития саркопении, в отличие от мышей, крыс Вистар и OXYS, где обусловленные возрастом нарушения структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы могут являться одной из основных причин развития возраст-зависимых патологий и, в частности, саркопении.

Ключевые слова: скелетная мышца, старение, митохондрии, электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0869813921060133

В настоящее время метаболические процессы, развивающиеся с возрастом в скелетных мышцах, достаточно хорошо изучены. Происходящее с возрастом постепенное ослабление мышечной функции (саркопении) связывают, прежде всего,

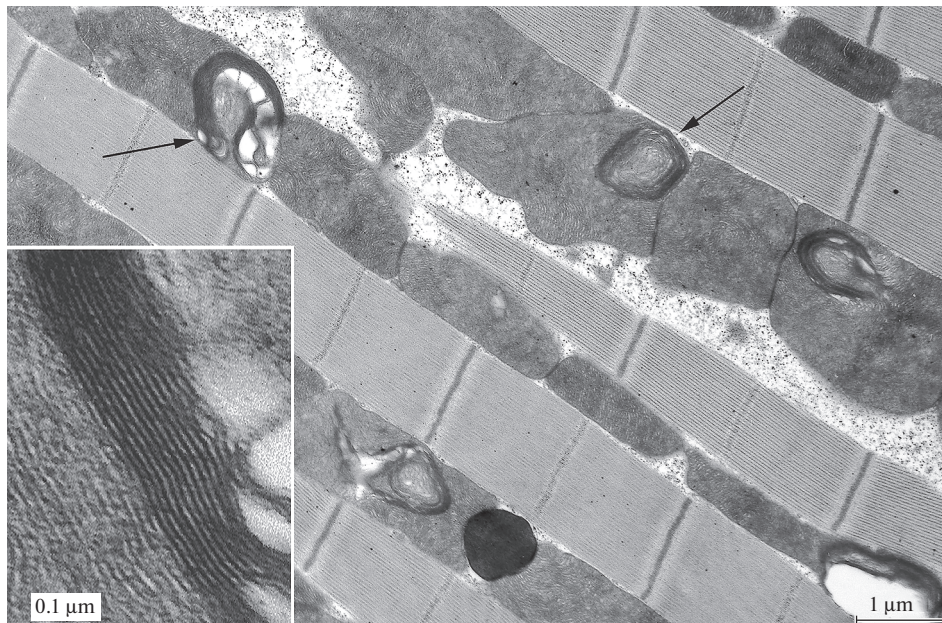


Рис. 1. Участок летательной мышцы *D. melanogaster* (36 суток после рождения). Стрелками показаны миело-подобные образования внутри митохондрий, детали строения которых представлены на врезке [11].

с функциональными характеристиками митохондрий. Многочисленные исследования показывают, что в скелетных мышцах центральным медиатором развития патологий являются процессы, связанные с митохондриями [1–7]. С возрастом в мышечной ткани происходит общее снижение метаболизма митохондрий и уровня АТФ [8]. Уровень синтеза митохондриальных белков снижается на 40%, функциональная активность белков также снижается [9]. Возрастные изменения мышечной ткани могут быть вызваны, в том числе, и повышением продукции АФК митохондриями, что приводит к увеличению уровня окислительного стресса. В связи с ведущей ролью митохондрий в развитии возрастных изменений мышц, большой интерес представляет состояние ультраструктуры этих органелл, поскольку, как известно, важнейшей особенностью митохондрий является значительная динамичность их морфологии в ответ на различные изменения клеточного метаболизма.

Обусловленные возрастом перестройки ультраструктуры митохондрий в литературе менее известны, чем функциональные. Подробно изучена только одна модель — летательная мышца насекомых, на которой экспериментально показано возникновение уникальных, зависящих от возраста изменений организации митохондрий и установлены факторы, вызывающие эти структурные перестройки [10, 11]. В летательной мышце было обнаружено развитие с возрастом локальной перестройки отдельных зон внутренней митохондриальной мембраны в миелоподобные структуры, которые с возрастом распространялись на все пространство митохондрий, вызывая разрушение органеллы (рис. 1) [11]. В измененных участках митохондрий цитохромоксидазная активность не выявлялась, в отличие от нативной части, где реакция была положительная.

Очевидно, что эти перестройки ультраструктуры определяют дисфункцию митохондрий, влияющую на снижение летательной активности насекомых с возрастом, которое было показано еще в 1943 г. Williams с соавт. [12]. На *Drosophila* /штамм white¹¹¹⁸/ экспериментально подтверждено воздействие кислородного стресса на формирование в митохондриях возникающих с возрастом структурных перестроек [13]. Так, гипероксия в течение 4-х дней у 3–4-дневных особей дрозофилы вызывала появление в 35% митохондрий летательной мышцы локальные перестройки внутренней митохондриальной мембраны. 7 дней воздействия гипероксии приводило к образованию деструктивных изменений в 62% митохондрий, у контрольных особей такие изменения практически отсутствовали или наблюдались крайне редко. Проведенные нами эксперименты на *D. melanogaster* показали, что антиоксидант SkQ1 поддерживает нативное состояние ультраструктуры митохондрий, снижая количество деструктивных изменений или снижая степень их выраженности и, как следствие, — поддерживает летательную активность [14]. У особей, получавших SkQ1, количество деструктивных изменений митохондрий и степень их проявления ниже, чем у мух, не получавших SkQ1.

Данные литературы об изменениях с возрастом ультраструктуры митохондрий скелетной мышцы однородны: набухание митохондрий, уменьшение числа крист, снижение плотности матрикса, нарушения митохондриальных мембран [15–19]. В проводимых исследованиях состояния ультраструктуры митохондрий скелетных мышц при старении не учитываются особенности общей структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы. Согласно данным литературы, митохондриальный аппарат скелетных мышц имеет сложную структурную организацию. Еще в одном из первых электронно-микроскопических наблюдений Palade [20] показал, что в скелетных мышцах на уровне I-дисков митохондрии ветвятся между дисками соседних миофибрилл, и описал митохондрии звездчатой формы. Позднее Gauthier и Padykula [21], Bubenzer [22] на основе анализа одиночных срезов диафрагмы крысы предположили, что в скелетной мышце имеется три типа митохондрий: 1) тонкие ветвящиеся, расположенные поперек мышечного волокна; 2) более толстые, овальные, расположенные вдоль мышечного волокна; 3) сферические, расположенные у краев мышечного волокна с ответвлениями, ведущими к центру. На основе многих трехмерных реконструкций было показано, что в скелетных мышцах весь митохондриальный материал посредством специальных межмитохондриальных контактов собран в единую митохондриальную систему, образованную разветвленными гигантскими митохондриями, расположенными по обе стороны Z-линии и соединенными в единый митохондриальный каркас продольными тяжами митохондрий, расположенными вдоль пучков миофибрилл. Эта система была определена как митохондриальный ретикулум (рис. 2) [23, 24]. Методами высоковольтной электронной микроскопии на нативной ткани трех типов скелетной мышцы крыс было продемонстрировано, что митохондриальный ретикулум — это *in vivo* существующая структура, которая не является результатом процесса фиксации или стагнации мышечной ткани [25]. В настоящее время методами современной сканирующей микроскопии наглядно, в объеме продемонстрирована ультраструктура митохондриального ретикулума в скелетных мышцах [26]. В то же время некоторые авторы, обнаруживая на одиночных срезах скелетных мышц разветвленную сеть, образованную протяженными митохондриями, рассматривают ее как результат врожденной миопатии [27] или признак старения [28].

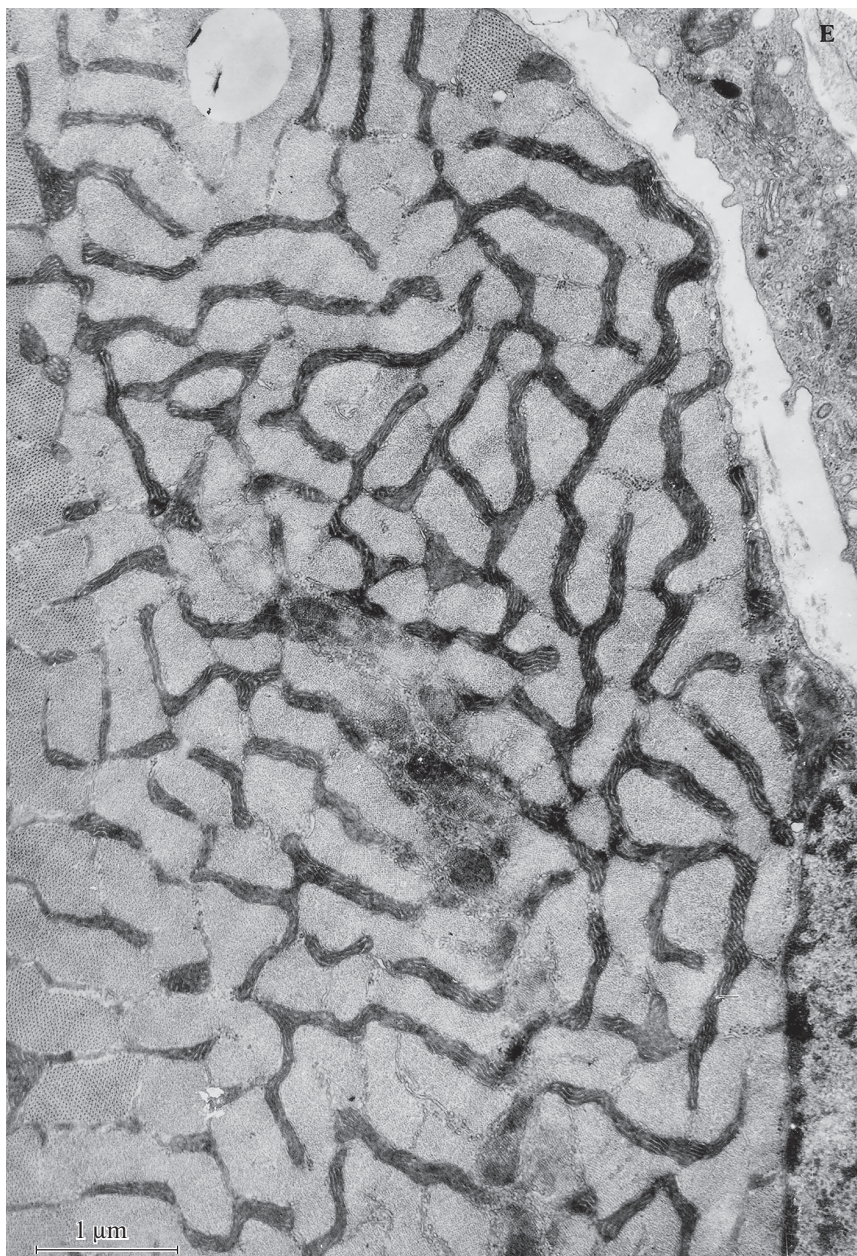


Рис. 2. Ультраструктура митохондриального ретикулума на поперечном срезе изотропной зоны мышечного волокна крысы Вистар [23].

Мы провели сравнительный анализ развития изменений ультраструктуры митохондрий скелетной мышцы с возрастом у представителей видов с различной продолжительностью жизни: мыши (C57BL/6) (продолжительность жизни 2.5–3 года); крысы Вистар (продолжительность жизни до 3 лет); крысы OXYS – модель прежде-

временно стареющих крыс (линия крыс OXYS, выведенная в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; характеризуется ранними инволютивными изменениями, повышенной частотой возникновения злокачественных опухолей, кардиомиопатией, нарушениями функций высшей нервной деятельности, характерными для стареющих животных и человека; продолжительность жизни до 2 лет); голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) – представитель животных с замедленным старением. Это небольшой грызун, по размерам и массе тела сопоставимый с мышью, однако без шерстяного покрова с эусоциальной организацией. Ареал обитания – засушливые районы Эфиопии, Кении и Сомали. Отличительная черта этого грызуна – экстремально высокая продолжительность жизни по сравнению с ожидаемой для его массы тела. Показано, что в лабораторных условиях голые землекопы живут более 30 лет [29, 30]. У голого землекопа практически отсутствуют такие заболевания, как диабет и рак, а также сердечно-сосудистые и неврологические патологии. Инфекционные патологии крайне редки [29], также характерна высокая устойчивость к гипоксии мозга [31–33].

Полученные ранее и в рамках этого исследования результаты совместно проанализированы и представлены в данной статье.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. (группа из 5 самцов) и 2.5 года (группа из 5 самцов) содержались при естественном свете, температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$, при свободном доступе к воде и пище (RK-120-1; Laboratorsnab, Россия). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с European Union Council Directive 86/609/EEC.

Голые землекопы (*Heterocephalus glaber*) в возрасте 6 мес. (4 рабочих самца) и 5 лет (4 рабочих самца) содержались в колониях в Институте исследований животных в зоопарке и в дикой природе им. Лейбница, в искусственной системе нор с туннелями и плексигласовыми боксами. В системе поддерживалась температура $26\text{--}29^\circ\text{C}$ с высокой относительной влажностью 60–80%. В боксах была деревянная подстилка, мелкие веточки и кусочки необеленой бумаги. Свежая еда была доступна ежедневно без ограничений и включала сладкий картофель, морковь, яблоки, фенхель, крупы с витаминами и минералами и овсяные хлопья. Забор материала был одобрен этической комиссией “Landesamt für Gesundheit und Soziales”, Берлин, Германия (#ZH 156).

Для исследования ультраструктуры митохондриального аппарата скелетной мышцы забирали ткань широких мышц бедра, латеральной, медиальной и промежуточной (*musculus vastus lateralis, -medius, -intermedius*). Для электронно-микроскопического исследования образцы фиксировали 3%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 2 ч при 4°C ; затем дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия в фосфатном буфере в течение 1.5 ч и обезвоживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией спирта – 50; 60; 70; 96 и 100%. Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон 812. Серийные ультратонкие срезы делали алмазным ножом на ультрамикротоме Leica ULTRACUT UCT (Leica, Германия). Срезы контрастировали цитратом свинца. Полученные препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) с помощью цифровой камеры Olympus QUEMESA (Olympus Corporation, Япония).

Для морфометрического исследования хондриома скелетной мышцы было отобрано по 20 фотографий с увеличением $\times 1500$ для каждого животного. На фотогра-

фиях продольных срезов мышечного волокна с помощью графического редактора Adobe® Photoshop®, выделялись все сечения митохондрий на срезе, а также, с помощью инструмента “Счетчик” (Count tool), подсчитывалось количество сечений. Используя полученные данные, а также известный масштаб снимка, с помощью пакета анализа Photoshop были рассчитаны необходимые параметры:

- количество сечений митохондрий на квадратный микрометр мышечного волокна;
- средняя площадь одного сечения митохондрии на срезе;
- соотношение общей площади сечений митохондрий на срезе к общей площади мышечного волокна, которое определяет объемную долю митохондрий в объеме волокна.

Для расчетов статистических показателей использовалась программа STATISTICA® 8. Данные представлены в виде средних значений, погрешности соответствуют стандартной ошибке. Для проверки нормальности распределений использовались критерии Шапиро–Уилкса и Колмогорова–Смирнова. Степень достоверности определялась с помощью критерия Манна–Уитни. При необходимости делалась поправка Бонферрони на множественное сравнение. Достоверным считалось значение $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты проведенного нами электронно-микроскопического исследования, ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы мышцей соответствует литературным представлениям, полученным на основе трехмерных реконструкций по ультратонким серийным срезам [23, 24]. На рис. 3 – поперечный срез через изотропную зону мышечного волокна мышцы C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. Хорошо видна развитая единая сеть митохондриального ретикулума, которую составляет система нитчатых протяженных митохондрий, расположенных в изотропной области мышечного волокна. Субсарколеммальные митохондрии на уровне изотропной области входят в эту единую систему посредством ответвлений, ведущих к центру мышечного волокна.

На рис. 4 представлена электронно-микроскопическая картина продольного среза скелетной мышцы мышцей C57BL/6 в возрасте 2.5 месяцев. Митохондриальный ретикулум, образованный системой разветвленных митохондрий, на продольном сечении мышечного волокна выглядит в виде небольших сферических или эллипсоидных органелл, расположенных попарно в изотропной области по обе стороны Z-дисков (рис. 4). Местами в изотропной зоне параллельно Z-дискам проявляются удлиненные сечения митохондрий (стрелка 1 на рис. 4). Субсарколеммальная популяция митохондрий, расположена под сарколеммой на периферии мышечного волокна (стрелка 2 на рис. 4).

Мы обнаружили, что с возрастом структура хондриома скелетной мышцы мышцей претерпевает значительные изменения по сравнению с молодыми животными. На поперечных сечениях мышечного волокна скелетной мышцы мышцей C57BL/6 в возрасте 2.5 года можно видеть значительную редукцию митохондриального ретикулума (рис. 5). В изотропной зоне мышечного волокна отсутствует сеть митохондриального ретикулума – видны лишь отдельные митохондрии овальной или извитой неправильной формы.

Наиболее наглядно редукция с возрастом митохондриального аппарата волокон скелетной мышцы мышцей демонстрируется на продольном сечении мышечного волокна. На рис. 6 можно видеть, что митохондриальный материал в мышечных во-

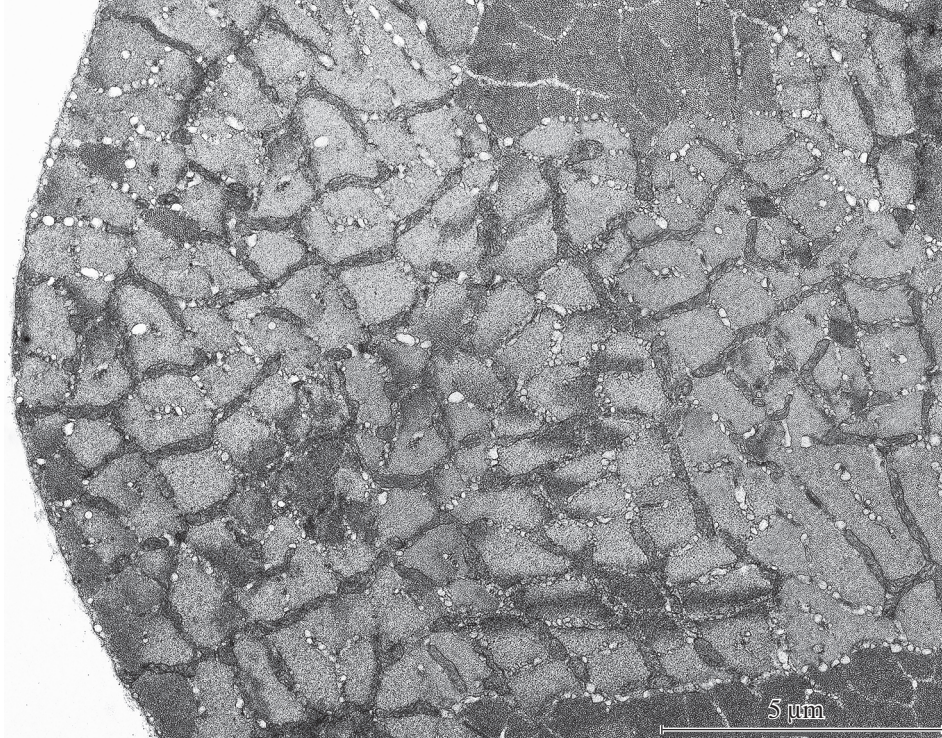


Рис. 3. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на поперечном срезе изотропной зоны мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес.

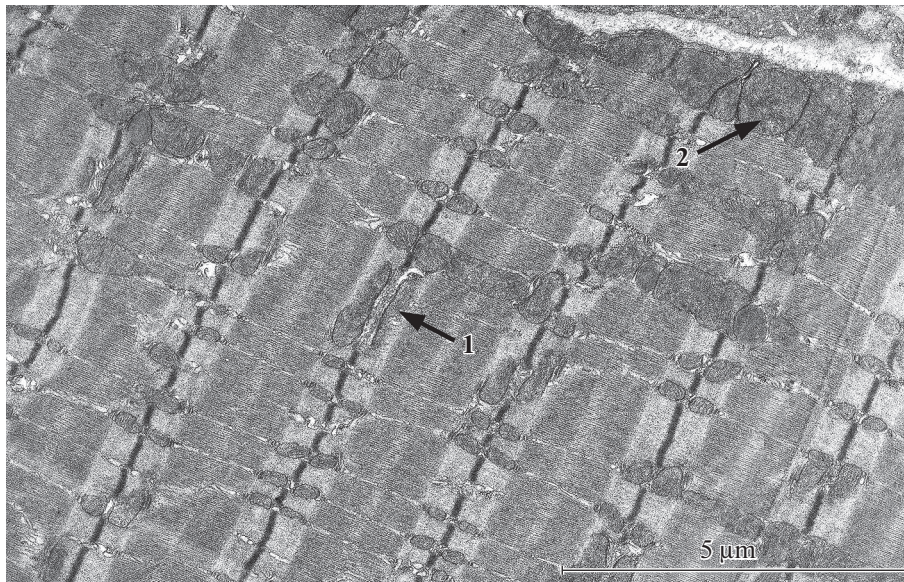


Рис. 4. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на продольном срезе мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. Стрелка 1 – удлиненные сечения митохондрий в изотропной зоне параллельно Z-дискам. Стрелка 2 – субсарколеммальная популяция митохондрий.

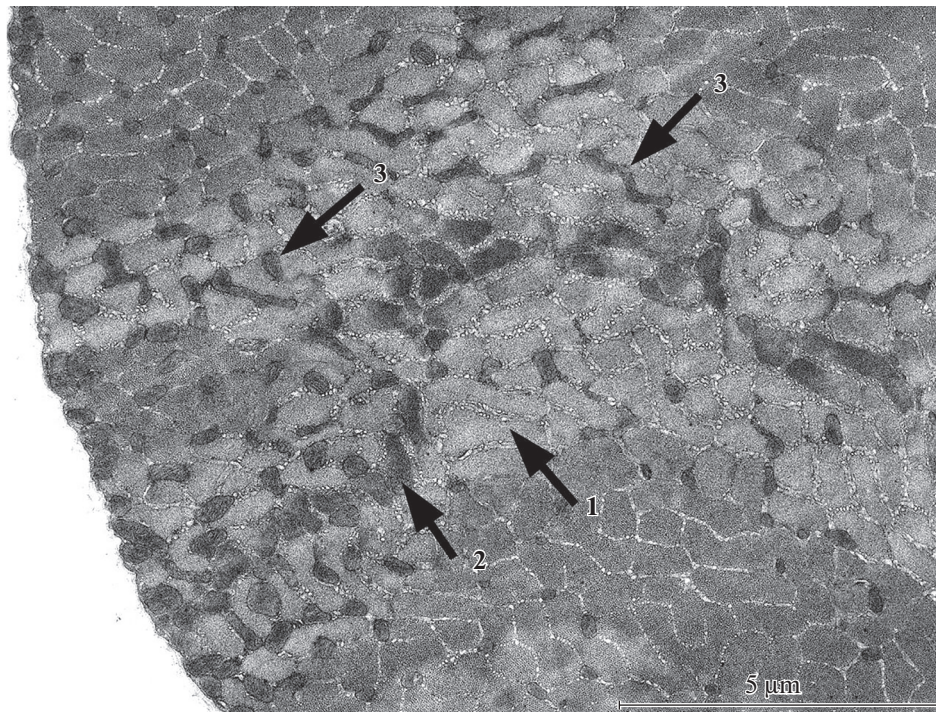


Рис. 5. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на поперечном срезе изотропной зоны мышечного волокна мышцы C57BL/6 в возрасте 2.5 года. Стрелка 1 – изотропная зона мышечного волокна; стрелка 2 – Z-диск; стрелка 3 – митохондрии.

локнах слабо выражен и представлен мелкими митохондриями, расположенными в основном вдоль миофибрилл.

Сравнительная картина изменений общей структуры хондриома, развивающихся в скелетной мышце мыши с возрастом, показана на рис. 7, где на одном увеличении представлены участки мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 месяцев (рис. 7а) и в возрасте 2.5 года (рис. 7б). В то же время изменений внутренней организации митохондрий скелетной мышцы у мышей в возрасте 2.5 года нами обнаружено не было.

Морфометрическое исследование возможных изменений хондриома скелетной мышцы, обусловленных возрастом, у мышей C57BL/6 было проведено на 20 электронно-микроскопических снимках для каждого животного (100 снимков на группу) (см. раздел Методы исследования).

На рис. 8 представлены результаты морфометрического анализа. У животных в возрасте 2.5 лет наблюдалось практически двукратное снижение среднего количества сечений митохондрий на 1 мкм^2 мышечного волокна по сравнению с 2.5-месячными животными (0.23 ± 0.02 против 0.45 ± 0.07 шт на мкм^2 соответственно) (рис. 8а) при одновременном увеличении средней площади одного сечения митохондрии — с $0.15 \pm 0.01 \text{ мкм}^2$ в 2.5 мес. до $0.22 \pm 0.01 \text{ мкм}^2$ в 2.5 года (рис. 8б). В це-

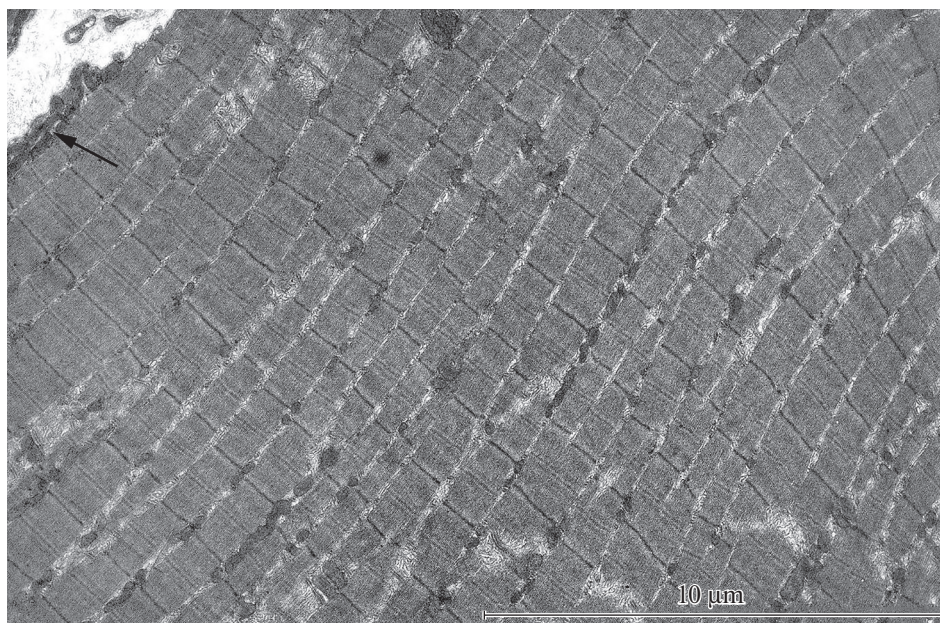


Рис. 6. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на продольном срезе мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 года. Стрелкой показана субсарколеммальная популяция митохондрий.

лом, объемная доля митохондрий скелетной мышцы у мышей C57BL/6 снизилась с возрастом с $6.81 \pm 1.51\%$ в 2.5 мес. до $5.44 \pm 0.38\%$ в 2.5 года (рис. 8с).

Таким образом, площадь хондриома в скелетной мышце мышей C57BL/6 снижается с возрастом за счет почти двукратного снижения количества сечений митохондрий в мышечном волокне (рис. 8). При этом объемная доля митохондрий изменяется не столь значительно. Можно предположить, что снижение числа митохондрий в некоторой степени компенсируется увеличением их размеров.

Полученные данные возрастных изменений митохондриального аппарата скелетной мышцы мышей полностью соответствуют ранее опубликованным результатам исследования возрастных нарушений структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы крыс Вистар — еще одного представителя короткоживущих грызунов [34]. Морфометрические исследования показывают, что у крыс Вистар к 24-м месяцам площадь хондриома изотропной зоны значительно снижается (с 38 до 24%, $p < 0.05$) (рис. 9). В то же время у крыс линии OXYS, как показали опубликованные нами ранее результаты [34], к 24-м месяцам площадь хондриома изотропной зоны снижается более значительно: с 17 до 6%, $p < 0.05$, т.е. у крыс OXYS площадь, занимаемая митохондриями, почти в 5 раз меньше, чем у крыс Вистар (24% для Вистар и всего 6% для OXYS, $p < 0.05$) (рис. 9).

У крыс линии OXYS, в отличие от мышей и крыс Вистар, изменения структуры митохондриального аппарата мышечной ткани начинают развиваться уже в возрасте 3-х месяцев и затрагивают не только общую организацию хондриома, но и внутреннюю ультраструктуру митохондрий. Нами была обнаружена удивительная

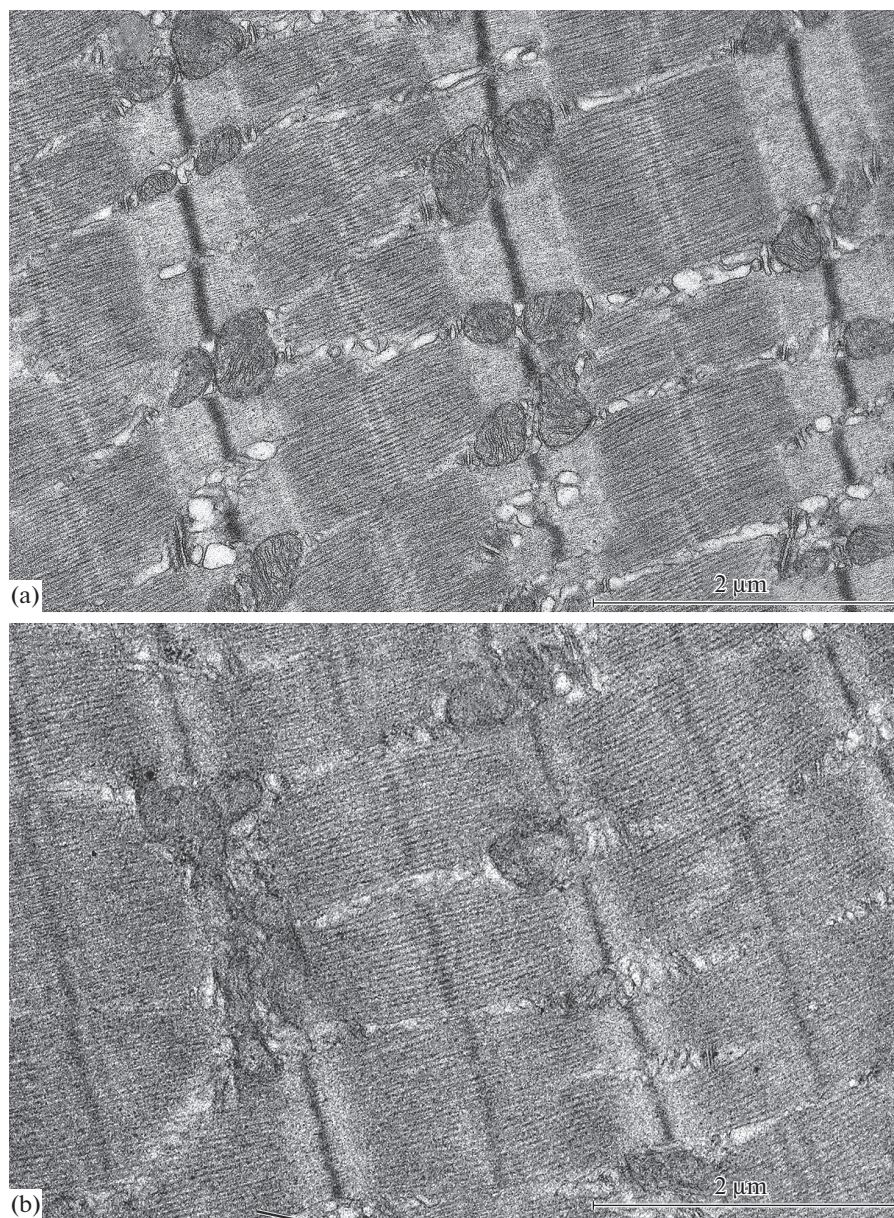


Рис. 7. Сравнительная картина изменений общей структуры хондриома, развивающихся в скелетной мышце мыши с возрастом. Участок продольного среза мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. (a); в возрасте 2.5 года (b).

перестройка ультраструктурной организации митохондрий, неизвестная ранее в литературе — митохондрии в виде протяженных извитых органелл, у которых пространство матрикса представлено продольно расположенными двумя—тремя кристами, а межмембранное пространство имеет вид локальных расширений, запол-

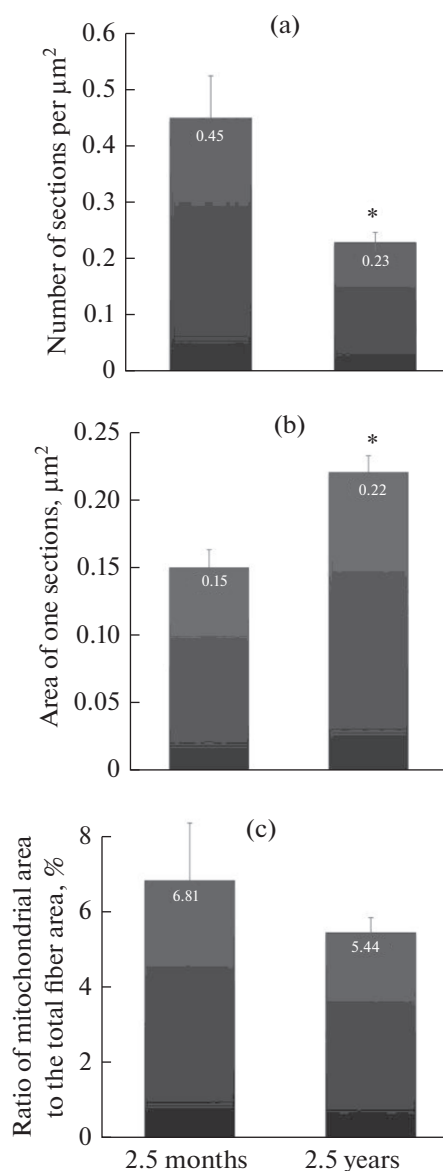


Рис. 8. Количественная оценка динамики изменений хондриома скелетной мышцы мышей C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. и 2.5 года. (а) – количество митохондрий (шт.) на $1 \mu\text{m}^2$ мышечного волокна, (б) – площадь сечения одной митохондрии, (с) – объемная доля митохондрий мышечного волокна. * – различие достоверно ($p < 0.05$). Погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

ненных гомогенным веществом (обычно межмембранное пространство митохондрий электронно-прозрачное) (рис. 10) [35]. Первые признаки такой перестройки в виде локальных увеличений межмембранного пространства появляются в митохондриях скелетной мышцы крыс линии OXYS еще в 3-месячном возрасте.

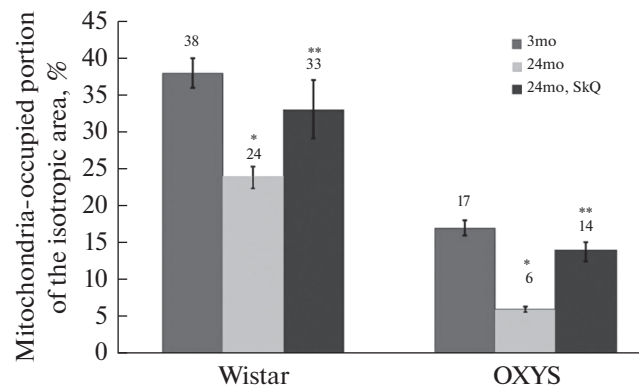


Рис. 9. Отношение суммарной площади митохондрий, расположенных в изотропной области к общей площади изотропной области у крыс Вистар и OXYS (%) [34]. * – $p < 0.05$ при сравнении с 3-месячными животными Вистар или OXYS соответственно; ** – $p < 0.01$ по сравнению с 24-месячными животными.

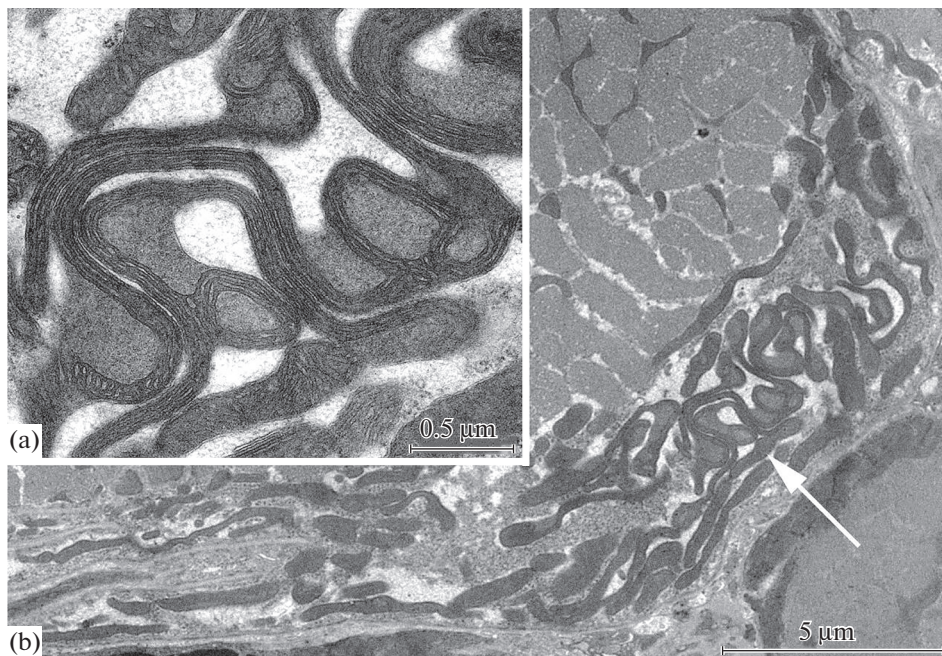


Рис. 10. Скопление атипичных митохондрий в субсарколеммальной области мышечного волокна крыс OXYS в возрасте 24 мес. (a) – обзорная фотография; стрелкой показана группа митохондрий, представленная на рисунке (b) на большем увеличении [35].

Наряду с изменениями митохондриального аппарата происходят нарушения структуры мышечных волокон в целом: появляются обширные области разрушенных миофибрилл, области аутофагосомальной активности. Таким образом, у крыс OXYS степень патологических изменений мышечной ткани значительно выше, чем у крыс Вистар. Антиоксидант SkQ1 снижал степень патологических изменений митохондриального аппарата скелетной мышцы у крыс OXYS. Прием SkQ1 в течение 6 мес. (с 18 мес.) приводил к сохранению суммарной площади митохондрий изотропной зоны (этот показатель менялся с 6 до 14%, $p < 0.01$) (рис. 9). Поскольку ключевой характеристикой крыс OXYS является усиленная генерация радикалов кислорода митохондриями, эти данные соответствуют литературным представлениям, согласно которым митохондрии играют центральную роль в развитии возрастных патологических процессов в скелетной мышце [36]. Необходимо отметить, что и у крыс Вистар прием антиоксиданта SkQ1 в течение 5 мес. (с 19 мес.) оказывал значительный защитный эффект. Площадь хондриома изотропной зоны скелетной мышцы крыс Вистар с возрастом снижалась незначительно по сравнению с молодыми животными (3 мес.): с 38 до 33% соответственно (рис. 9). Таким образом, митохондриальный антиоксидант SkQ1, оказывая защитный эффект на уровне митохондрий, останавливает процесс дегенерации на органном уровне.

Наши исследования показали, что с возрастом в скелетных мышцах мышей C57BL/6 и крыс Вистар и OXYS происходят значительные нарушения общей организации и структуры митохондриального аппарата за счет уменьшения как числа митохондрий, так и размеров отдельных органелл.

С полученными нами результатами для короткоживущих грызунов полностью расходятся имеющиеся к настоящему времени предварительные данные по исследованию митохондриального аппарата голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) [37, 38]. Как было показано ранее, в скелетной мышце крыс после рождения постепенно количество митохондрий значительно увеличивается, митохондрии объединяются друг с другом, шаг за шагом создавая трехмерный ретикулум. Этот процесс завершается к 1.5–2-месячному возрасту [24]. Однако у голых землекопов даже к возрасту 6 мес. митохондрии мелкие, одиночные как на поперечных, так и на продольных сечениях мышечного волокна (рис. 11а). К возрасту 5-ти лет количество и размер митохондрий значительно возрастает, однако митохондриальная сеть так и не формируется (рис. 11б).

У голого землекопа с возрастом наблюдались следующие морфометрические изменения хондриома скелетной мышцы: число сечений митохондрий выросло вдвое и составило 0.47 ± 0.03 шт на мкм^2 для пятилетних животных (0.23 ± 0.02 шт на мкм^2 в 6 мес.) (рис. 12б). Средняя площадь сечения одной митохондрии выросла к пяти годам до 0.29 ± 0.03 с 0.21 ± 0.1 мкм^2 в 6 мес. (рис. 12а). Объемная доля хондриома в 6 месяцев составила $4.77 \pm 0.42\%$ и к пяти годам увеличилась практически трехкратно – до $12.68 \pm 1.81\%$ (рис. 12с). Таким образом, у голого землекопа к 5-ти годам не только не развиваются патологические изменения митохондриального аппарата скелетной мышцы, но и наоборот – происходит существенный рост, усиление хондриома, хотя при этом митохондрии так и не объединяются в ретикулум.

Эти данные позволяют предположить, что в скелетной мышце голого землекопа к возрасту 5 лет митохондриальный ретикулум все еще находится в процессе формирования, которое у крыс и мышей, как указывалось, заканчивается уже в 1.5–2 мес.

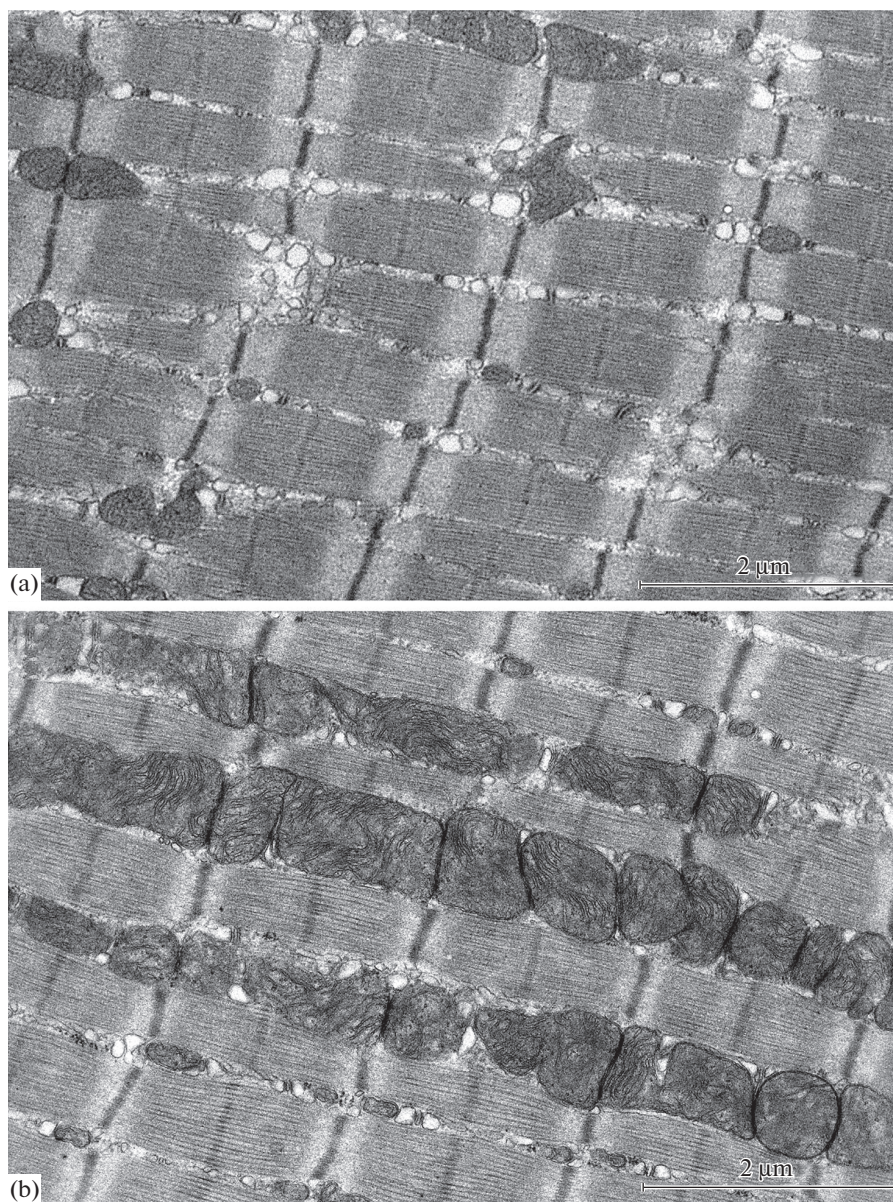


Рис. 11. Ультраструктура продольного среза мышечного волокна скелетной мышцы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) в возрасте: 6 мес. (a); 5 лет (b).

В свете этих данных, атипичную модель развития ультраструктуры хондриома скелетной мышцы у голого землекопа можно рассматривать как длительную задержку развития — замедление старения. В настоящее время предполагается, что замедление старения может быть следствием неотении — сохранение ювенильных черт у половозрелой особи [38].

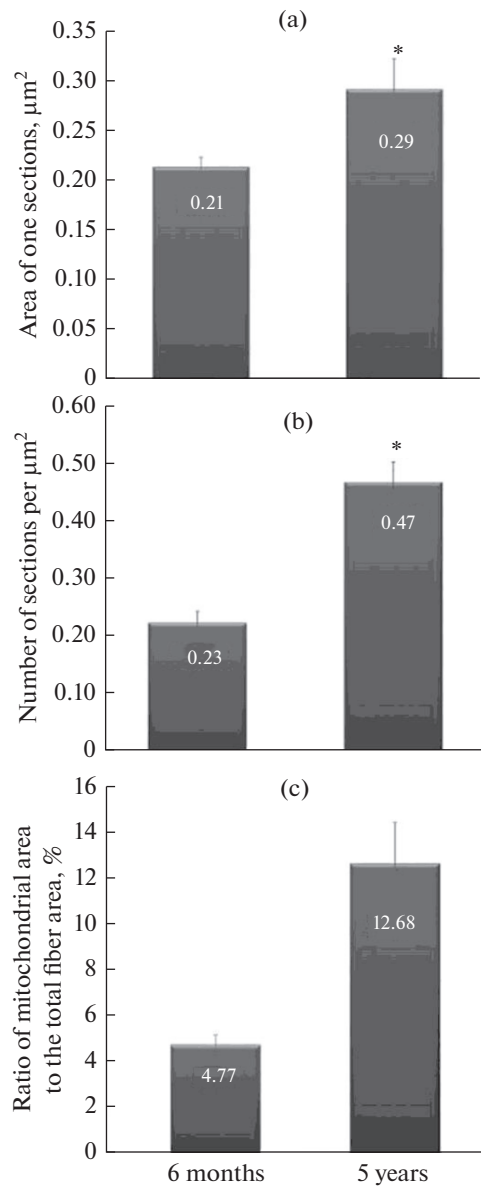


Рис. 12. Количественная оценка динамики изменений хондриома скелетной мышцы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) в возрасте 6 месяцев и 5 лет. (a) – площадь сечения одной митохондрии ($\mu\text{км}^2$). (b) – количество митохондрий (в шт.) на $1 \mu\text{км}^2$ мышечного волокна. (c) – объемная доля хондриома (%). * – различие достоверно при уровне $p < 0.05$. Погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

Можно предположить, что формирующаяся к 5-летнему возрасту в скелетной мышце голого землекопа особая организация митохондриального аппарата обеспечивает необходимый уровень окислительно-восстановительных процессов в мышцах, предупреждая снижение работоспособности и развитие саркопении.

Обнаруженные нами развивающиеся с возрастом нарушения структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы как у мышей C57BL/6, так и у крыс Вистар и OXYS, очевидно, отражают нарушения в функционировании этих органелл и могут являться одной из основных причин развития возраст-зависимых патологий и, в частности, саркопении.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00578-а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Б.Л.Е., экспериментальная часть исследований – В.В.Б., В.И.М., математическая обработка данных – Э.Ч.М., написание и редактирование манускрипта – В.В.Б., В.И.М., Э.Ч.М., Б.Л.Е.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baumann CW, Kwak D, Liu HM, Thompson VL* (2016) Age-induced oxidative stress: How does it influence skeletal muscle quantity and quality? *J Appl Physiol* 121: 1047–1052. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00321.2016>
2. *Brunk UT, Terman A* (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269: 1996–2002. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02869.x>
3. *Derbré F, Gratas-Delamarche A, Gómez-Cabrera MC, Viña J* (2014) Inactivity-induced oxidative stress: A central role in age-related sarcopenia? *Eur J Sport Sci* 14: 98–108. <https://doi.org/10.1080/17461391.2011.654268>
4. *Gamboa JL, Billings FT, Bojanowski MT, Gilliam LA, Yu C, Roshanravan B, Roberts LJ, Himmelfarb J, Ikizler TA, Brown NJ* (2016) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Physiol Rep* 4(9): e12780. <https://doi.org/10.14814/phy2.12780>
5. *Santos LS, Baraibar MA, Lundberg S, Eeg-Olofsson O, Larsson L, Friguet B* (2015) Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing. *Redox Biol* 5: 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.006>
6. *Moulin M, Ferreiro A* (2017) Muscle redox disturbances and oxidative stress as pathomechanisms and therapeutic targets in early-onset myopathies. *Semin Cell Dev Biol* 64: 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.003>
7. *Rygiel KA, Picard M, Turnbull DM* (2016) The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J Physiol* 594: 4499–4512. <https://doi.org/10.1113/JP271212>
8. *Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS* (2014) Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Heal* 3: 6. <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-6>
9. *Johnson ML, Robinson MM, Nair KS* (2013) Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends Endocrinol Metab* 24: 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.12.003>

10. Sacktor B, Shimada Y (1972) Degenerative changes in the mitochondria of flight muscle from aging blowflies. *J Cell Biol* 52: 465–477.
<https://doi.org/10.1083/jcb.52.2.465>
11. Bakeeva LE, Saprunova VB, Pasyukova EG, Roicina HB (2007) Митоптоз в летательной мышце *Drosophila melanogaster*. Докл Акад наук 413: 1–3 [Bakeeva LE, Saprunova VB, Pasyukova EG, Roshina NV (2007) Mitoptosis in the flight muscle of *Drosophila melanogaster*. *Acad Sci Rep* 413: 1–3 (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0012496607020111>
12. Williams CM, Barnes LA, Sawyer WH (1943) The utilization of glycogen by flies during flight and some aspects of the physiological ageing of *Drosophila*. *Biol Bull (Woods Hole)* 84: 263–268.
<https://doi.org/10.2307/1538009>
13. Walker DW, Benzer S (2004) Mitochondrial “swirls” induced by oxygen stress and in the *Drosophila* mutant hyperswirl. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10290–10295.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403767101>
14. Anisimov VN, Bakeeva LE, Egormin PA, Filenko OF, Isakova EF, Manskikh VN, Mikhelson VM, Panteleeva AA, Pilipenko DI, Piskunova TS, Popovich IG, Saprunova VB, Samoylova TA, Semchenko AV, Skulachev MV, Tyndyk ML, Vyssokikh MY, Yurova MN, Zabezhinsky MA, Skulachev VP (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 5. SkQ1 prolongs lifespan and prevents development of traits of senescence. *Biochemistry (Moscow)* 73: 1329–1342.
<https://doi.org/10.1134/s0006297908120055>
15. Beregi E, Regius O, Huttli T, Gobl Z (1988) Age-related changes in the skeletal muscle cells. *Z Gerontol* 21: 83–86. PMID: 2968024
16. Бакарев МА, Непомнящих ЛМ (2004) Структурные проявления нарушений митохондриальной функции в скелетных мышцах у преждевременно стареющих крыс OXYS. Бюлл эксп биол и мед 138: 674–679. [Bakarev MA, Nepomnyashchikh LM (2004) Structural manifestations of mitochondrial dysfunction in skeletal muscles in premature aging OXYS rats. *Bull Exp Biol Med* 138: 674–679 (In Russ)].
17. Corsetti G, Pasini E, D’Antona G, Nisoli E, Flati V, Assanelli D, Dioguardi FS, Bianchi R (2008) Morphometric changes induced by amino acid supplementation in skeletal and cardiac muscles of old mice. *Am J Cardiol* 101: 26E–34E.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.078>
18. Crane JD, Devries C, Safdar A, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA (2010) The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol* 65: 119–128.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029785>
19. Orlander J, Kiessling K, Larsson L, Karlsson J, Aniansson A (1978) Skeletal muscle metabolism and ultrastructure in relation to age in sedentary men. *Acta Physiol Scand* 104: 249–261.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1978.tb06277.x>
20. Palade GE (1956) Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In: *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*. Acad Press New York 185–215.
21. Gauthier GF, Padykula HA (1966) Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. *J Cell Biol* 28: 333–354.
<https://doi.org/10.1083/jcb.28.2.333>
22. Bubenzer HJ (1966) Die dunnen und die dicken Muskelfasern des Zwerchfells der Ratte. *Z Zellforsch* 69: 520–550.
<https://doi.org/10.1007/BF00406300>
23. Bakeeva LE, Skulachev VP, Chentsov YS (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim Biophys Acta* 501: 349–369.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90104-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90104-4)
24. Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP (1981) Ontogenesis of mitochondrial reticulum in rat diaphragm muscle. *Eur J Cell Biol* 25: 175–181.
25. Kirkwood SP, Munn EA, Brooks GA (1986) Mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. *Am J Physiol* 251: 395–402.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1986.251.3.C395>
26. Glancy B, Hartnell LM, Malide D, Yu ZX, Combs CA, Connelly PS, Subramaniam S, Balaban RS (2015) Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature* 523: 617–620.
<https://doi.org/10.1038/nature14614>
27. Pellegrini G, Barbieri S, Moggio M, Cheldi A, Scarlato G, Minetti C (1985) A case of congenital neuromuscular disease with uniform type I fibers, abnormal mitochondrial network and jagged

- Z-line. *Neuropediatrics* 16: 162–166.
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1059533>
28. *Leduc-Gaudet JP, Picard M, Pelletier FSt-J, Sgarioto N, Auger MJ, Vallée J, Robitaille R, St-Pierre DH, Gouspillou G* (2015) Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget* 6: 17923–17937.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4235>
 29. *Buffenstein R* (2008) Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *Compar Physiol B* №178: 439–445.
<https://doi.org/10.1007/s00360-007-0237-5>
 30. *Orr ME, Garbarino VR, Salinas A, Buffenstein R* (2015) Sustained high levels of neuroprotective, high molecular weight, phosphorylated tau in the longest-lived rodent. *Neurobiol Aging* 36: 1496–1504.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.004>
 31. *Larson J, Park TJ* (2009) Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. *NeuroReport* 20: 1634–1637.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32833370cf>
 32. *Maina JN, Gebreegziabher Y, Woodley R, Buffenstein R* (2001) Effects of change in environmental temperature and natural shifts in carbon dioxide and oxygen concentrations on the lungs of captive naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*): a morphological and morphometric study. *J Zool* 253: 371–382.
<https://doi.org/10.1017/S0952836901000346>
 33. *Park TJ, Lu Y, Jüttner R, Smith EJ, Hu J, Brand A, Wetzel C, Milenkovic N, Erdmann B, Heppenstall PA, Laurito CE, Wilson SP, Lewin GR* (2008) Selective Inflammatory Pain Insensitivity in the African Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber*). *PLoS Biol* January 6: 13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060013>
 34. *Eldarov CM, Vangely IM, Kolosova NG, Bakeeva LE, Skulachev VP* (2014) Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure. *Aging* 6: 140–148.
<https://doi.org/10.18632/aging.100636>
 35. *Bakeeva LE* (2015) Age-Related Changes in Ultrastructure of Mitochondria. Effect of SkQ1. *Biochemistry* 80: 1582–8.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915120068>
 36. *Marzetti E, Hwang JC, Lees HA, Wollgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, Bernabei R, Leeuwenburgh C* (2010) Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta* 1800: 235–244.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.007>
 37. *Holtze S, Eldarov CM, Vays VB, Vangeli IM, Vysokikh MY, Bakeeva LE, Skulachev VP, Hildebrandt TB* (2016) Study of Age-Dependent Structural and Functional Changes of Mitochondria in Skeletal Muscles and Heart of Naked Mole Rats (*Heterocephalus glaber*). *Biochemistry* 81: 1703–1712.
<https://doi.org/10.1134/S000629791612004>
 38. *Skulachev VP, Holtze S, Vysokikh MY, Bakeeva LE, Skulachev MV, Markov AV, Hildebrandt TB, Sadvonichii VA* (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to “naked apes” (humans). *Physiol Rev* 97: 699–720.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2015>

**Comparative Analysis of Age-Related Changes in the Structure
of the Mitochondrial Apparatus of Skeletal Muscles in Species
with Different Life Spans**

V. B. Vays^a, I. M. Vangeli^a, Ch. M. Eldarov^a, and L. E. Bakeeva^{a, *}

^a*Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Moscow, Russia*

**e-mail: bakeeva@belozersky.msu.ru*

Comparative analysis of age-related changes in the ultrastructure of the mitochondrial apparatus of skeletal muscle was performed using electron microscopic and morphometric methods in specimens with different aging programs: short-lived, well-studied classical species – mice (C57BL/6), Wistar rats; prematurely aging OXYS rats; and animals with delayed aging – naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). In mice age-related

changes in organization of the mitochondrial apparatus of skeletal muscle was shown to correspond with the previously studied for Wistar rats: the mitochondrial reticulum is formed to 2.5–3 months of age, to 30 months of age there is a significant reduction of the mitochondrial apparatus as the result of a decline in the number of mitochondria – number of sections of mitochondria in muscle fibers is reduced by almost 2 times – from 0.45 ± 0.074 sections per μm^2 to 0.23 ± 0.017 sections per μm^2 . Destructive changes in the mitochondrial ultrastructure were not observed, in contrast to OXYS rats, in which age-related changes in the chondriome affect both the overall structure of the mitochondrial apparatus of muscle fibers and the internal ultrastructure of organelles. At the same time, in a small rodent similar in size to mice, *Heterocephalus glaber*, the number and size of mitochondria in skeletal muscle increases significantly by the age of five, but the mitochondrial reticulum does not form.

Keywords: skeletal muscle, aging, mitochondria, electron microscopy