

運動前の身体加温は運動時の骨格筋損傷を 抑制するか否か

—熱ショックタンパク質70 (HSP70) の発現からの検討—

日本医科大学 三上俊夫
(共同研究者) 同 太田成夫

Heat Stress Suppresses Skeletal Muscle Damage after Downhill Running

by

Toshio Mikami

*Department of Health and Sports Science,
Nippon Medical School*

Shigeo Ohota

*Department of Biochemistry and Cell Biology,
Institute of Gerontology, Nippon Medical School*

ABSTRACT

These experiments were designed to investigate whether elevation of heat shock protein 70 (HSP70) in skeletal muscle prior to exercise contributes to protect from skeletal muscle damage induced by eccentric exercise. In experiment 1, male ICR mice were exposed to 30 min of hyperthermia at 42 °C. Soleus and extensor digitorum longus (EDL) were excised under the anaesthesia 24h after the exposure to heat. The amount of HSP70 in both skeletal muscles was determined by SDS-PAGE and western blot. Heat stress significantly increased the amount of HSP70 in both soleus and EDL muscle compared with the resting level. In experiment 2, male ICR mice were divided into two groups, exercise group and heat+exercise group. Heat+exercise group of mice was exposed to the same heat stress 24 h before exercise as experiment 1. Both groups of mice performed 60 min of downhill running (-20 degrees, 25 m/min). Skeletal muscles and plasma were removed under

anesthesia 12, 24 and 48 h after downhill running. Creatine kinase (CK) activity in plasma increased 12 h and 24 h after downhill running, while β -glucuronidase activity in soleus and EDL increased 48 h after downhill running. However, heat+exercise group of mice showed more suppressed level in both enzyme activities compared with exercise group. These findings suggest that heat stress prior to downhill running induces skeletal muscle HSP70 and leads to protective effect against skeletal muscle injury induced by downhill running

要 約

本研究では事前のHSP70の増加が運動時の骨格筋損傷を抑制するか否かについて検討した。実験1ではマウスに42℃、30分間の熱ストレスを負荷し、24時間後にヒラメ筋と長指伸筋を採取してHSP70を定量した。実験2ではマウスを運動群と熱負荷+運動群の2群に分けて、熱負荷+運動群には運動負荷の24時間前に実験1と同様の熱ストレスを負荷した。その後、各群マウスに60分間の下り坂走を負荷した。運動12、24、48時間後にヒラメ筋、長指伸筋と血漿を採取し、骨格筋損傷の指標である骨格筋 β -glucuronidase活性と血漿CK活性を測定した。主要な結果は以下の通りである。熱負荷により直腸温は有意に上昇し、ヒラメ筋と長指伸筋のHSP70量は有意な増加を示した。下り坂走後12時間での血漿CK活性は熱負荷+運動群が運動群に比し有意な低値を示した。運動群でみられた運動48時間後のヒラメ筋の β -glucuronidase活性の上昇が熱負荷+運動群ではみられなかった。また、長指伸筋の β -glucuronidase活性は48時間後に両群ともに有意な上昇を示したが、熱負荷+運動群の上昇は運動群に比べ有意な低値を示した。これらの結果より、運動前の熱負荷は運動後の筋損傷を抑制することが明らかとなった。この原因としては熱負荷により骨格筋のHSP70が増加したことが関係したと考えられる。

目 的

熱ショックタンパク質 (heat shock protein: HSP) は生体が熱、低酸素、グルコース枯渇などの種々のストレスを受けた場合に生体内で合成されるタンパク質である。HSPは分子量により数種類に分けられるが、その中でも分子量70kDaの熱ショックタンパク質70 (heat shock protein 70: HSP70) はストレス耐性との関係が最も良く研究されている。ストレス耐性とHSP70発現の関係には、事前の熱ストレスによりHSP70増加を引き起こした細胞では、その後に致死性ストレスを負荷した際の細胞死が抑制されることが知られている¹⁾。すなわちHSP70の増加はストレス耐性の亢進をもたらす。

一方、運動習慣のないヒトが運動を行った時には遅発性筋肉痛が生じ、ひどい場合には骨格筋の損傷が生ずる²⁾。しかし、一度この筋肉痛や筋損傷を経験すると次に同様な運動を行った際の筋肉痛や筋損傷が軽減される³⁻⁶⁾。この生体反応は先に述べたHSP70増加に由来するストレス耐性の獲得現象と非常に良く似た現象である。

このHSP70増加によるストレス耐性の獲得と遅発性筋肉痛の抑制との共通した性質に着目して、本研究では運動前の骨格筋HSP70の増加が運動後の筋損傷を抑制するか否かについて検討した。そのため実験1ではマウスを麻酔下で42℃の高温下に暴露して骨格筋HSP70の変動を調べた。実

験2では、運動前に熱ストレスを負荷したマウスと負荷しないマウスに対して下り坂走を負荷し、骨格筋損傷の指標として広く用いられている血漿 creatine kinase (CK) 活性と骨格筋の β -glucuronidase 活性を経時的に比較した。これらの実験結果から骨格筋の HSP70 発現と骨格筋損傷の関係について検討した。

1. 方法

1. 1 実験1

実験動物には8週令の ICR 雄マウスを用い、これらを安静群と熱負荷群に分けた。1週間の予備飼育の後に熱負荷群マウスをネンプタル麻酔下で42℃のインキュベーター内に30分間置き熱ストレスを負荷した。その後、室温に戻して通常飼育を行い、24時間後にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血してマウスを屠殺して骨格筋（ヒラメ筋、長指伸筋）を採取して、直ちに液体窒素にて凍結して分析まで-80℃で凍結保存した。血液は遠心分離して血漿を回収して分析まで-80℃で凍結保存した。

1. 2 実験2

8週令の ICR 雄マウスを運動群と熱負荷+運動群の2群に分けた。両群マウスとも1週間の予備飼育中に1日1回、10分間のトレッドミル走を行わせトレッドミル走に慣らした。熱負荷+運動群には運動実施の24時間前に実験1と同様の熱ストレスを負荷した。運動は下り坂走を行わせた。走行条件はトレッドミル傾斜角度-20度、トレッドミル速度25m/min、運動時間60分間で行った。運動終了後は通常飼育を行い運動後12時間、24時間、48時間に実験1と同様にマウスを屠殺して血漿と骨格筋を採取して分析まで-80℃で凍結保存した。

1. 3 分析方法

骨格筋はホモジェナイズした後に遠心分離して上清を回収し、この上清を用いて HSP70 量と β -glucuronidase 活性を測定した。その概略を以下に示す。凍結保存した骨格筋組織を10倍量のホモジェナイズバッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DDT, 0.1% CHAPS) 中でホモジェナイズし、遠心分離 (10,000rpm/30min) して上清を回収し、この上清のタンパク質濃度を Comassie Pluse Protein Assay Reagent (Pierce 社製) にて bovine serum albumin 溶液を標準液として測定した。

HSP70 の測定は Naito ら⁷⁾ の方法に準じた。以下にその概略を示す。タンパク質量で 20 μ g 相当のホモジェナイズ上清を 12% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動⁸⁾ にかけた後、ウエット式プロッティング装置 (Bio Rad 社製) にてタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にウエスタンプロット法にて転写した。転写終了後、メンブレンを T-TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.9% Tween-20) で洗浄して、5% スキムミルクを含む T-TBS にてブロッキング処理 (4℃, 12時間) を行った。メンブレンを T-TBS にて洗浄した後、HSP70 に対するモノクロナル抗体 (Streagen SPA-810) と反応させ (室温, 2時間), 引き続き alkaline phosphatase 標識の抗マウス IgG と反応させた (室温, 2時間)。最終的にメンブレンを T-TBS とミリQ水にて洗浄し、AttoPhos 試薬キットと反応させ、蛍光強度をフルオロイメージアナライザー FLA-2000 (富士フイルム社製) にて検出して HSP70 量を定量化した。

β -glucuronidase 活性は Koskinen らの方法⁹⁾ に準じて測定し、血漿中の creatine kinase (CK) 活性は CPK テストワコー (和光純薬) によって測定した。

1. 4 統計処理

結果は全て平均値±標準偏差で表した。実験間の平均値の検定には一元配置分散分析と多重比較検定 (FisherのPLSD) を用い、いずれの場合も危険率5%以下を有意とした。

2. 結果

2. 1 実験1

熱ストレス負荷により直腸温は負荷前の36.1 ± 1.0℃から負荷直後の41.1 ± 1.0℃へと有意な上昇をした。

熱ストレス負荷24時間後のヒラメ筋のHSP70量の変化を図1に示した。写真は実際のウエスタンブロットにおける典型的な測定結果を示した。図は各群のウエスタンブロット結果を定量化した値の平均値±標準偏差を示したものである。熱ストレス負荷によりヒラメ筋のHSP70量は対照群の約2倍へと有意な増加を示した (p<0.05)。

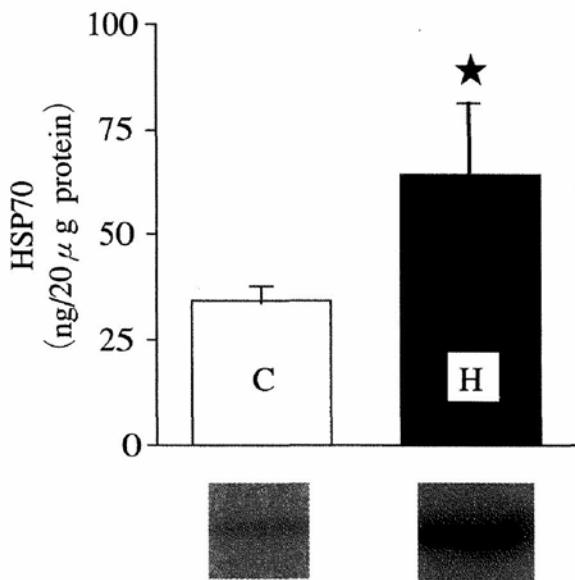


図1 Soleus HSP70 content of resting animals and those killed 24 h after exposure to heat stress. HSP70 content was assessed by western blotting. Gels were loaded with 20 μg of protein. Data are the mean ± SE. A representative western blot for each group is shown immediately below the histogram. C: control sedentary; H: 24 h after heat stress (42°C, 30 min). ★ p<0.05 vs control sedentary.

図2は長指伸筋におけるHSP70の変化をヒラメ筋と同様に示したものである。ヒラメ筋と同様に

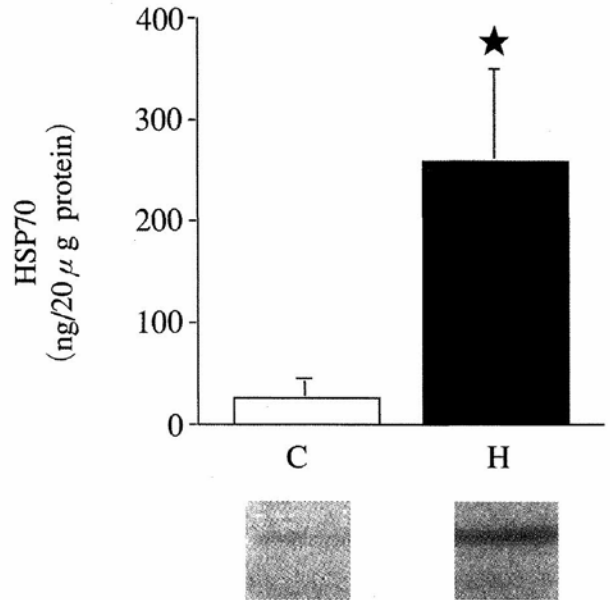


図2 EDL HSP70 content of resting animals and those killed 24 h after exposure to heat stress. HSP70 content was assessed by western blotting. Gels were loaded with 20 μg of protein. Data are the mean ± SE. A representative western blot for each group is shown immediately below the histogram. C: control sedentary; H: 24 h after heat stress (42°C, 30 min). ★ p<0.05 vs control sedentary.

熱ストレス負荷により長指伸筋のHSP70量は有意な増加を示したが (p<0.05)、その増加率はヒラメ筋より大きく対照群の約5倍に達した。

2. 2 実験2

血漿CK活性は両群とも下り坂走の12時間後で安静値に対して有意な上昇を示し (p<0.05)、その後徐々に安静値へと回復した。しかし、熱負荷+運動群の上昇は運動群に対し運動後12時間と24時間で有意な低値を示した (図3)。

ヒラメ筋と長指伸筋のβ-glucuronidase活性値の変化を図4と図5におのおの示した。ヒラメ筋のβ-glucuronidase活性値は運動24時間後までは有意な増加を示さなかったが、運動群では運動48時間後で有意な上昇を示した (p<0.05)。しかし、熱負荷+運動群ではこの上昇が認められなかった。一方、長指伸筋のβ-glucuronidase活性は下り坂走の48時間後に両群ともに有意な上昇を示したが (p<0.05)、熱負荷+運動群の上昇は運動群に比べ有意な低値を示した (p<0.05)。

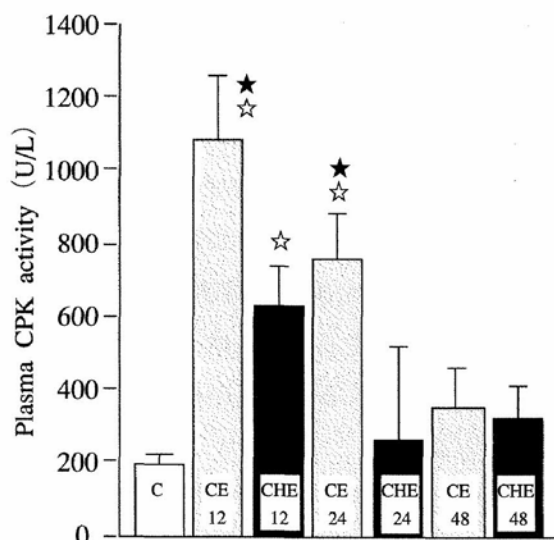


図3 Plasma CPK activity of the mice exposed to downhill running.
 C: control sedentary; C12, CE24 and CE48: 12, 24 and 48 h after downhill running without heat stress; CHE12, CHE24 and CHE48: 12, 24 and 48 h after downhill running with heat stress. ☆ p<0.05 vs control sedentary. ★ p<0.05 between CE and CHE.

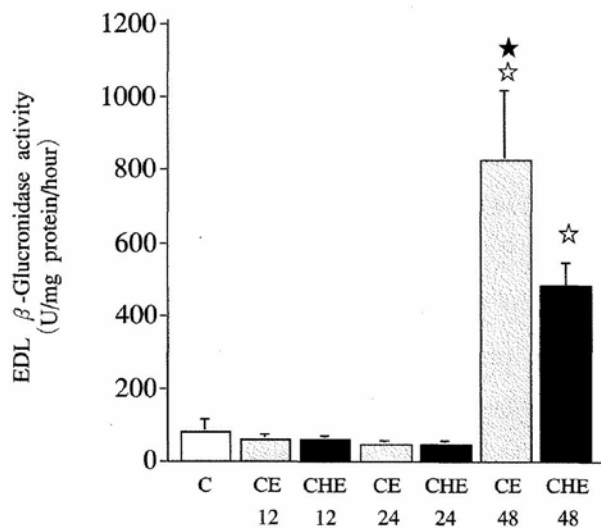


図5 EDL beta-Glucuronidase activity of the mice exposed to downhill running.
 C: control sedentary; C12, CE24 and CE48: 12, 24 and 48 h after downhill running without heat stress; CHE12, CHE24 and CHE48: 12, 24 and 48 h after downhill running with heat stress. ☆ p<0.05 vs control sedentary. ★ p<0.05 between CE48 and CHE48.

3. 考察

本実験において、運動負荷24時間前に熱ストレスを負荷したマウスにおいて、運動後の血漿CK活性と骨格筋のbeta-glucuronidase活性の上昇抑

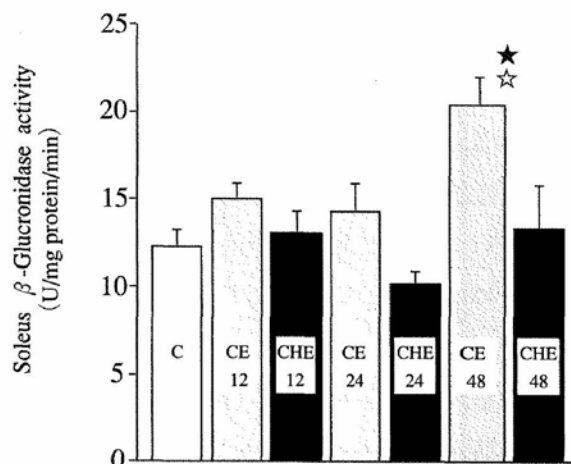


図4 Soleus beta-Glucuronidase activity of the mice exposed to downhill running.
 C: control sedentary; C12, CE24 and CE48: 12, 24 and 48 h after downhill running without heat stress; CHE12, CHE24 and CHE48: 12, 24 and 48 h after downhill running with heat stress. ☆ p<0.05 vs control sedentary. ★ p<0.05 between CE48 and CHE48.

制がみられた。この結果より、運動前の熱負荷は運動後の筋損傷の発生を抑制することが示唆された。

HSP70の増加には種々のストレス刺激が関与するが、その中でも熱負荷は最も一般的なストレス刺激である。細胞に対して熱負荷(42℃/30分)をするとHSP70の増加が起こり、その増加は熱負荷48時間後まで持続する¹⁰⁾。一方、個体レベルでの熱負荷による組織HSP70の変化に関しては、Flanaganらは¹¹⁾熱ストレス負荷48時間後で肝臓、小腸、腎臓ではHSP70が増加したが、骨格筋と脳では増加しなかったと報告している。一方、Naitoらは⁷⁾熱ストレス負荷8時間後に骨格筋HSP70が増加することを報告している。このように、熱ストレス負荷による骨格筋HSP70の反応については一致した結果が得られていない。そこで、われわれは実験1において熱ストレス負荷24時間後の骨格筋HSP70の変化を調べたところ、速筋(長指伸筋)と遅筋(ヒラメ筋)ともに熱ストレス負荷の24時間後において骨格筋HSP70は有意な増加を示した(図1)。この結果を基に、本研究では骨格筋HSP70の増加が認められた熱ストレス負荷後24時間の時点で運動負

荷を行うこととした。

本実験において運動負荷には下り坂走を用いた。この理由は、下り坂走は伸長性筋収縮が多用され、この伸長性筋収縮を繰り返す運動が最も筋への刺激が大きく、結果として骨格筋の損傷を引き起こし易いためである。このことに関してArmstrongらは¹²⁾、登り坂走と下り坂走とで運動後の筋損傷の程度を調べ、下り坂走の方が筋損傷の指標である骨格筋 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDase) 活性の上昇と組織学的な筋損傷の所見が著しいことを報告している。そして本研究では骨格筋の損傷指標として血漿CK活性と骨格筋 β -glucuronidase 活性を用いた。しかし、血漿CK活性と骨格筋 β -glucuronidase 活性の変動には経時的な違いがみられた。すなわち、血漿CK活性は運動後12時間で上昇したのに対し、骨格筋 β -glucuronidase 活性は運動後48時間で上昇した。この両者の上昇に時間差が生ずることは先行研究でも報告されている。Komulainenらは¹³⁾ ラットに下り坂走を負荷した時の血漿CK活性と骨格筋 β -glucuronidase 活性の変化を比較し、血漿CK活性は運動2時間後から上昇するのに対して骨格筋 β -glucuronidase 活性は48時間後から上昇し始め、その上昇は96時間後まで続いたと報告している。また、Sakamotoら¹⁴⁾ も伸長性筋収縮後のラットの血漿CK活性は運動後2~4時間後でピーク値を示すと報告している。一方、ヒトでの伸長性筋収縮運動による血漿CK活性の変化はラット、マウスとは異なり、運動48時間後で上昇する¹⁵⁾。ラット、マウスとヒトとの血漿CK活性の変化の違いの原因については不明であるが、本研究での両活性値の変化は従来の報告と一致しており、筋損傷を調べる動物実験モデルとしては適切な実験条件であったことが確認された。

血漿CK活性はラット、マウスの場合は運動直後から上昇するが、この上昇は骨格筋組織での酵素活性の変化や病理学的筋損傷の所見と一致しな

いことから、血漿CPK活性値の変化は骨格筋の損傷を反映するものではないと考えられている^{13,16)}。一方、骨格筋 β -glucuronidase 活性の上昇は直接的に骨格筋の損傷を表す指標であり^{17,18)}、本研究において運動負荷前日に熱ストレス負荷したマウスで下り坂走後の骨格筋 β -glucuronidase 活性の上昇抑制が生じたことは、運動前の熱負荷が下り坂走に由来する骨格筋の損傷を抑制したことを示唆している。

事前の熱ストレス負荷が骨格筋の損傷を抑制した最大の要因は熱ストレス負荷による骨格筋HSP70の増加であったと考えられる。そして、このHSP70の増加が骨格筋損傷を抑制した原因にはHSP70の持つ二つの生理的作用が関係する。その一つはシャペロン機能である。シャペロン機能とはストレスを受けたタンパク質にHSP70が結合してタンパク質の変性や凝集を抑制して細胞死を防ぐ働きである¹⁹⁾。そしてHSP70を強発現させた細胞ではシャペロン活性が亢進して熱ストレスに対するストレス耐性が高まる²⁰⁾。本研究で負荷したような激しい運動は骨格筋での活性酸素の生成を亢進させ、活性酸素の増加は細胞内タンパク質の酸化修飾を増加させる²¹⁾。これらの酸化修飾タンパク質は細胞内のタンパク分解機構により分解を受けるが、細胞膜タンパク質が活性酸素により酸化され分解を受けることが細胞の機能低下を引き起こし、強いては骨格筋損傷がもたらされると考えられる。この時、運動前の熱ストレス負荷により増加したHSP70は、酸化修飾を受けたタンパク質に結合してタンパク質の構造維持に働くことでタンパク質の分解を減少させて筋細胞の機能維持に貢献し、その結果として骨格筋の損傷が抑制されたことが推測された。

そしてHSP70増加のもう一つの重要な働きはアポトーシスの抑制である。事前の熱ストレス負荷によりHSP70を誘導した細胞ではアポトーシスが抑制される²²⁻²⁴⁾。一方、伸展状態で固定さ

れた骨格筋での筋収縮は細胞膜タンパク質の消失と骨格筋細胞のアポトーシスを引き起こし²⁵⁾、長時間運動はマウス骨格筋細胞のアポトーシスを引き起こす²⁶⁾。これらの先行研究の結果から、伸張性筋収縮を多用する下り坂走では運動負荷により骨格筋細胞のアポトーシスが誘導されたことが予想される。この時に事前の熱ストレス負荷により骨格筋 HSP70 が増加していたマウスでは HSP70 によりアポトーシスが抑制され、結果として筋損傷の抑制が起こったことが推測された。

今回の結果は運動前の熱ストレス負荷が運動後の骨格筋損傷マーカーの上昇を抑制することを示したが、あくまでもこの結果は酵素活性の変化のみを調べた結果であり、実際の筋肉痛や組織所見における変化を調べた結果ではない。この点を考慮し、今後はヒトを被験者にした実験で、骨格筋のみに熱ストレス負荷して、その後に運動を実施した際の筋肉痛の変化などを調べていく実験が必要であると考えている。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に助成して下さった、財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団、ならびに研究に協力して下さった日本医科大学学生の四倉寛子さん、賀来佳男君、山沖佳愛さん、山岡宣行君に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Gerner E.W., Schneider M.J., Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature*, 256, 500-502 (1975)
- 2) Sorichter S., Mair J., Koller A., Calzolari C., Huonker M., Pau B., Puschendorf B., Release of muscle proteins after downhill running in male and female subjects. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 11, 28-32 (2001)
- 3) Schwane J.A., Armstrong R.B., Effect of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats. *J. Appl. Physiol.*, 55, 969-975 (1983)
- 4) Nosaka K., Clarkson P., M. Effect of eccentric exercise on plasma enzyme activities previously elevated by eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 69, 492-497 (1994)
- 5) Nosaka K., Clarkson P.M., Influence of previous concentric exercise on eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Sports Sci.*, 15, 477-483 (1997)
- 6) Nosaka K., Sakamoto K., Newton M., Sacco P., How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med. Sci. Sports Exerc.*, 33, 1490-1495 (2001)
- 7) Naito H., Powers S.K., Demirel H.A., Sugiura T., Dodd S.L., Aoki J., Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J. Appl. Physiol.*, 88, 359-363 (2000)
- 8) Laemmli U., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- 9) Koskinen S.O., Wang W., Ahtikoski A.M., Kjaer M., Han X.Y., Komulainen J., Kovanen V., Takala T.E., Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280, R1 292-1300 (2001)
- 10) Theodorakis N.G., Drujan D. De Maio A., Thermotolerant Cells Show an Attenuated Expression of HSP70 after Heat Shock. *J. Biol. Chem.*, 274, 12081-12086 (1999)
- 11) Flanagan S.W., Ryan A.J., Gisolfi C.V., Moseley P.L., Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress. *Am. J. Physiol.*, 268, R28-32 (1995)
- 12) Armstrong R.B., Ogilvie R.W., Schwane J.A., Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 54, 80-93 (1983)
- 13) Komulainen J., Kytola J., Vihko V., Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats. *J. Appl. Physiol.*, 77, 2299-2304 (1994)
- 14) Sakamoto K., Nosaka K., Shimegi S., Ohmori H., Katsuta S., Creatine kinase release from regenerated muscles after eccentric contractions in rats. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 73, 516-520 (1996)
- 15) Clarkson P.M., Nosaka K., Braun B., Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24, 512-520 (1992)
- 16) Komulainen J., Takala T.E., Vihko V., Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? *Int. J.*

- Sports Med.*, 16, 150-154 (1995)
- 17) Salminen A., Lysosomal changes in skeletal muscles during the repair of exercise injuries in muscle fibers. *Acta. Physiol. Scand.*, 124, 1-31 (1985)
 - 18) Salminen A., Kihlstorm M., Protective effect of indomethacin against exercise-induced injuries in mouse skeletal muscle fibers. *Int. J. Sports. Med.*, 8, 46-49 (1987)
 - 19) Parsell D.A., Lindquist S., The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27, 437-496 (1993)
 - 20) Nollen E.A., Brunsting J.F., Roelofsen H., Weber L.A., Kampinga H.H., In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2069-2079 (1999)
 - 21) Lee J., Goldfarb A.H., Rescino M.H., Hegde S., Patrick S., Apperson K., Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34, 443-448 (2002)
 - 22) Li C-Y, Lee J-S, Ko Y-G, Kim J-I Seo J-S. Heat shock protein 70 inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release and Upstream of Caspase-3 Activation. *J. Biol. Chem.*, 275, 25665-25671 (2000)
 - 23) Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T., Taylor P., Morimoto R.I., Cohen G.M., Green D.R., Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell. Biol.*, 2, 469-475 (2000)
 - 24) Saleh A., Srinivasula M.S., Balkir L., Robbins D.P., Alnemri S.E., Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell. Biol.*, 2, 476 - 483 (2000)
 - 25) Biral D., Jakubiec-Puka A., Ciechomska I., Sandri M., Rossini K., Carraro U., Betto R., Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. *Acta. Neuropathol.*, 100, 618-626 (2000)
 - 26) Podhorska-Okolow M., Saddri M., Zampieri S., Brun B., Rossini K., Carraro U., Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 24, 518-531 (1998)