

© Коллектив авторов, 2024
УДК 612.744.14/616-001.32
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19052>
ISSN – 2073-8137

Влияние аллогенного мышечного экстракта на протеолитическую активность поврежденных скелетных мышц крыс

М. В. Стогов, Н. А. Кононович, Е. А. Киреева

Национальный медицинский исследовательский центр травматологии
и ортопедии им. академика Г. А. Илизарова, Курган, Российская Федерация

Influence of allogenic muscle extract on proteolytic activity of damaged skeletal muscles of rats

Stogov M. V., Kononovich N. A., Kireeva E. A.

National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Ortopaedics,
Kurgan, Russian Federation

В эксперименте изучены отсроченные изменения протеолитической активности в скелетных мышцах, поврежденных в результате сдавливания, на фоне применения аллогенного мышечного экстракта. Исследование выполнено на 66 крысах-самцах линии Wistar: группа 1 – интактные животные; группа 2 (контроль) – животным на 3-и сутки после мышечной травмы разово вводили внутримышечно физиологический раствор; группа 3 (опыт) – животным на 3-и сутки после мышечной травмы разово вводили внутримышечно лиофилизат аллогенных мышечных белков. В передней большеберцовой (ПББМ) и камбаловидной мышце (КМ) поврежденного сегмента определяли протеолитическую активность (ПА) и содержание миозина, в сыворотке крови – активность креатинфосфокиназы (КФК). Обнаружено, что применение лиофилизата мышечных белков достоверно снижало ПА в ПББМ и КМ. Значимых изменений уровня миозина в группах крыс в отдаленные сроки эксперимента (30–90 дней) не отмечено. Активность КФК в сыворотке крови крыс опытной группы была достоверно ниже значений группы контроля. Таким образом, введение аллогенного мышечного экстракта, полученного из поврежденных скелетных мышц, способствовало снижению ПА в травмированных мышцах у крыс.

Ключевые слова: скелетные мышцы, травма мышц, стимуляция репарации, аллогенный экстракт, протеолиз

The experiment studied delayed changes in proteolytic activity in skeletal muscles damaged by compression, against the background of the use of allogeneic muscle extract. The study was performed on 66 male Wistar rats: group 1 – intact animals; group 2 (control) – animals received a single intramuscular injection of saline on the 3rd day after muscle injury; group 3 (experiment) – animals received a single intramuscular injection of allogeneic muscle protein lyophilisate on the 3rd day after muscle injury. Proteolytic activity (PA) and myosin content were determined in the anterior tibial muscle (ATM) and soleus muscle (SM) of the damaged segment, and creatine phosphokinase (CPK) activity in the blood serum. It was found that the use of muscle protein lyophilisate significantly reduced PA in the ATM and SM. No significant changes in the myosin level were noted in the groups of rats at late stages of the experiment (30–90 days). The activity of CPK in the blood serum of rats in the experimental group was significantly lower than the values in the control group. Thus, the introduction of allogeneic muscle extract obtained from damaged skeletal muscles contributed to a decrease in PA in injured muscles in rats.

Keywords: skeletal muscle, muscle injury, stimulation of repair, allogeneic extract, proteolysis

Для цитирования: Стогов М. В., Кононович Н. А., Киреева Е. А. Влияние аллогенного мышечного экстракта на протеолитическую активность поврежденных скелетных мышц крыс. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2024;19(3):234-237. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19052>

For citation: Stogov M. V., Kononovich N. A., Kireeva E. A. Influence of allogenic muscle extract on proteolytic activity of damaged skeletal muscles of rats. *Medical News of North Caucasus*. 2024;19(3):234-237. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19052> (In Russ.)

КМ – камбаловидная мышца
КФК – креатинфосфокиназа
ПА – протеолитическая активность
ПББМ – передняя большеберцовая мышца

IGF-1, IGF-2 – инсулиноподобные факторы роста 1 и 2
PDGF-AA – тромбоцитарный фактор роста AA
TGF- α , TGF- β 1 – трансформирующие факторы роста α и β 1
VEGF – васкулоэндотелиальный фактор роста α и β 1

Повреждение скелетных мышц в результате травм и раздавливания является ключевым звеном в патогенезе большинства осложнений и последствий острой травмы, поэтому способы оптимизации репарации мышц являются актуальной проблемой фундаментальной и клинической медицины [1–3]. Основными направлениями стимуляции восстановления скелетных мышц после их повреждений в настоящее время являются технологии физиотерапевтической [4, 5] и фармакологической коррекций метаболизма мышц и/или купирования системных последствий синдрома раздавливания [6–8]. Достаточно перспективными выглядят способы активации репарации скелетных мышц комплексными препаратами, содержащими факторы роста. В этом плане, например, предлагается применение комплекса ростовых факторов [9], в том числе вырабатываемых тромбоцитами [10, 11]. Теоретической основой для использования лиофилизированного мышечного экстракта, полученного из поврежденных скелетных мышц, как аллогенного материала, являются данные о том, что поврежденные скелетные мышцы синтезируют множество ростовых факторов (т.н. миокины) для ауто- и паракриной регуляции процесса собственной репарации и окружающих органов [12, 13].

Цель исследования – оценить влияние применения аллогенного мышечного экстракта на систему протеолиза в скелетных мышцах, поврежденных в результате сдавливания у крыс.

Материал и методы. Исследование выполнено на 66 крысах-самцах линии Wistar, возраст 8 месяцев. Животные были распределены на три группы. Группа 1 (n=18) – интактные животные, у которых каких-либо манипуляций не проводили. Группа 2 (контроль, n=24) – животным на 3-и сутки после моделирования мышечной травмы вводили локально внутримышечно физиологический раствор. Группа 3 (опыт, n=24) – животным на 3-и сутки после моделирования мышечной травмы вводили локально внутримышечно лиофилизат аллогенных мышечных белков.

Экспериментальное моделирование синдрома сдавливания производили путём полного пережатия правой голени в верхней трети корнцангом в течение 60 секунд, воспроизводимость методики отмечена в работе [14]. Процедуру выполняли в условиях операционной, под общим наркозом, адаптированным по весу (Рометар 2 %, 1–2 мг/кг, Чехия; Золетил 100, 10–15 мг/кг, Франция). После оперативного вмешательства животных помещали в клетки по две особи. В качестве послеоперационной анальгезии использовали Анальгин (Биосинтез, Россия) подкожно в дозе 30–50 мг/кг, два раза в день в течение 3 суток. На протяжении эксперимента в помещении вивария для содержания крыс поддерживался температурный режим в 24–26 °С. Животные содержались на стандартном сбалансированном рационе при свободном доступе к воде.

Стимуляцию репаративных процессов в мышцах крыс группы 3 проводили внутримышечной инъекцией в зону периферии травматологического поля в объеме 0,2 мл препарата на физиологическом растворе в дозе 1 мг лиофилизата на 1 кг веса в срок на третьи сутки после сдавливания (животным группы 2 по данной схеме вводили 0,1 мл физиологического раствора). Препарат (лиофилизат) получали из мышц голени, полученных от пяти крыс, которые находились на третьи сутки после моделирования сдавливания (предварительная серия). Леофилизат мышечного экстракта получали по модифицированной

для крыс оригинальной методике (патент РФ на изобретение № 2476234). В полученном мышечном экстракте обнаружен ряд факторов роста: IGF-1, IGF-2, VEGF, TGF- α , TGF- β 1, PDGF-AA. Концентрацию факторов роста определяли иммуноферментным методом на фотометре ELx808 (BIO-TEK Inc, США), используя наборы реактивов фирмы R&D Systems, Biotang Inc., Invitrogen (США).

По 6 животных из групп 2 и 3 выводили из эксперимента на 7, 14, 30 и 90-е сутки после травмы. По 6 животных группы 1 выводили из эксперимента на 7, 30 и 90-е сутки после начала эксперимента в группах 2 и 3 (срок 14 суток для интактных животных исключен, так как различия со сроком 7-е сутки не существенны). Эвтаназию проводили методом декапитации после предварительного наркотизирования препаратами, которые использовались для анестезии перед операцией и в тех же дозировках.

После эвтаназии от каждого животного забирали переднюю большеберцовую (ПББМ) и камбаловидную (КМ) мышцы травмированного сегмента, а также сыворотку крови. Мышцы отмывали от эритроцитов и размельчали в охлажденном 0,03М растворе KCl. Центрифугировали 15 мин при 14000 g на ультрацентрифуге Beckman&Coulter (США). В полученном надосадке (саркоплазматическая вытяжка) определяли общую протеолитическую активность (ПА) по Jorgensen в модификации [15]. Протеолитическую активность выражали в количестве аминокислот, образующихся за единицу времени на грамм саркоплазматического белка (мг а.к/г белка), концентрацию последнего определяли по Лоури. Из осадка, полученного после центрифугирования при 14000 g, выделяли миозин, для чего осадок сушили, взвешивали, заливали эквивалентным объемом (1:5) 0,6М раствора KCl, центрифугировали 10 мин при 6000 g. В полученном надосадке определяли содержание белка по Лоури. В сыворотке крови определяли активность креатинфосфокиназы (КФК) на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi 902 наборами реагентов Vital Diagnostic (РФ).

Исследование проведено при соблюдении принципов гуманного обращения с лабораторными животными в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. На проведение исследования получено одобрение комитета по этике при ФГБУ «НМИЦ ТО им. акад. Г. А. Илизарова» Минздрава России.

Результаты в таблицах представлены в виде медианы, 1–3 квартиля (Q1–Q3). Статистическую оценку значимости отличий изученных показателей между группами оценивали с помощью Т-критерия Манна – Уитни. Минимальный уровень значимости (p) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Изучение общей протеолитической активности мышечного экстракта показало, что у крыс группы 3 (опыт) значения ПА в ПББМ были достоверно ниже значений крыс группы 2 (контроль) на сроках 14, 30, 90 суток после травмы (табл. 1). При этом в данной группе значения ПА превышали значения животных группы 1 (интактные) на сроке 30-е сутки после травмы, тогда как в группе 2 (контроль) ПА в ПББМ была достоверно выше значений интактных животных в период с 14-х по 90-е сутки. ПА в КМ у крыс группы 3 относительно значений животных групп 1 и 2 была достоверное ниже на сроках 14-е и 90-е сутки после травмы.

Таблица 1

Общая протеолитическая активность
(мг а.к/г белка) в скелетных мышцах крыс
экспериментальных групп, медиана (Q1–Q3)

Мышца	Группа	7	14	30	90
ПББМ	1	10,8 (9,5–11,2)	10,8 (9,5–11,2)	12,2 (10,7–15,4)	11,4 (9,8–14,8)
ПББМ	2	4,9* (4,7–8,0)	48,8*& (45,9–50,1)	52,1*& (38,9–98,8)	46,9*& (30,8–60,5)
ПББМ	3	8,2 (6,8–12,3)	7,5& (6,5–11,5)	23,3*& (17,2–31,1)	7,3& (6,6–13,9)
КМ	1	14,0 (11,6–14,6)	14,0 (11,6–14,6)	12,0 (11,6–14,6)	15,3 (12,8–18,7)
КМ	2	6,3* (5,5–8,4)	12,5& (10,3–14,0)	57,3* (48,4–69,9)	20,8& (8,6–32,4)
КМ	3	9,8 (7,6–13,1)	5,9*& (4,8–7,1)	44,45* (34,3–56,3)	6,3*& (3,2–8,5)

Примечание: ПББМ – передняя большеберцовая мышца; КМ – камбаловидная мышца; * – уровень значимости различий по сравнению с интактными животными (группа 1) при $p < 0,05$; & – значения между опытной (группа 3) и контрольной группами (группа 2), достоверно отличающиеся при $p < 0,05$.

Содержание миозина в ПББМ животных опытной группы (группа 3) статистически значимо относительно значений животных группы контроля и интактной группы на сроках эксперимента не отличалось (табл. 2). На уровне тенденции прослеживалось то, что у животных группы контроля (группа 2) уровень миозина на всех сроках эксперимента был ниже значений группы 3. Эта же тенденция отмечалась и для динамики изменения уровня миозина в КМ у животных опытной группы (группа 3) относительно контрольной (группа 2).

Таблица 2

Содержание миозина (мг/г ткани) в скелетных
мышцах крыс экспериментальных групп,
медиана (Q1–Q3)

Мышца	Группа	7	14	30	90
ПББМ	1	31,8 (29,9–31,8)	31,8 (29,9–31,8)	32,4 (30,8–34,1)	30,9 (30,3–32,5)
ПББМ	2	27,8* (26,6–28,3)	28,9 (27,6–29,6)	28,7 (26,8–31,7)	30,0 (29,2–31,5)
ПББМ	3	29,5 (28,0–32,0)	32,2 (28,8–34,0)	32,0 (29,0–32,6)	31,7 (29,9–33,4)
КМ	1	28,0 (27,2–28,5)	28,0 (27,2–28,5)	28,8 (27,6–29,8)	29,7 (28,0–30,4)
КМ	2	26,6 (25,7–27,8)	25,8* (23,5–26,7)	26,0 (25,3–27,7)	27,0 (25,8–28,4)
КМ	3	26,8 (25,5–27,9)	26,8 (24,6–27,4)	26,5 (25,9–29,0)	28,1 (27,2–30,1)

Примечание: ПББМ – передняя большеберцовая мышца; КМ – камбаловидная мышца; * – уровень значимости различий по сравнению с интактными животными (группа 1) при $p < 0,05$.

Активность КФК в сыворотке крови крыс группы 3 (опыт) была достоверно ниже значений крыс группы 2 (контроль) на сроках 14, 30, 90 суток после травмы (табл. 3). Относительно группы 1 (интактные) в группе 3 активность КФК была достоверно выше на сроках 7, 14 и 30 суток после травмы, тогда как в группе 2 (контроль) активность КФК была достоверно выше значений интактных животных на всех сроках наблюдения.

Таблица 3

Активность креатинфосфокиназы (Е/л)
в сыворотке крови крыс экспериментальных групп,
медиана (Q1–Q3)

Группа	7	14	30	90
1	2713 (1860–3130)	2713 (1860–3130)	3054 (2908–3182)	2946 (2843–3102)
2	3523* (3283–4713)	3792*& (3561–4098)	8129*& (5895–8218)	4404*& (3922–4577)
3	3311* (3235–3592)	3155*& (2792–3416)	3381*& (3266–4005)	3043& (2989–3826)

Примечание: ПББМ – передняя большеберцовая мышца; КМ – камбаловидная мышца; * – уровень значимости различий по сравнению с интактными животными (группа 1) при $p < 0,05$; & – значения между опытной (группа 3) и контрольной группами (группа 2), достоверно отличающиеся при $p < 0,05$.

Оценивая полученные в ходе эксперимента данные, можно заключить, что внутримышечное введение мышечного экстракта, полученного из поврежденных скелетных мышц крыс (аллогенный материал), оказывало выраженное ингибирующее действие на протеолитическую систему скелетных мышц после их травматического повреждения. При этом влияние на синтез сократительных белков введения экстракта было несущественно.

В целом можно выделить две особенности наблюдаемого эффекта: 1) снижение ПА наблюдалось как в мышцах с преимущественно быстрыми мышечными волокнами (ПББМ), так и с преимущественно медленными (КМ); 2) антипротеолитический эффект развивался в течение более чем 5–11 суток после введения мышечного экстракта (на 7-е сутки после травмы, что соответствовало 4-м суткам после введения препарата, эффект еще не обнаруживался, а обнаруживался на 14-е сутки, т.е. на 11-е сутки после инъекции) и сохранялся продолжительное время (до 90-х суток). Это позволяет говорить о том, что использованный экстракт имел отсроченный и длительный эффект. Данный факт говорит о системной (гуморальной), не метаболической природе воздействия экстракта, видимо, благодаря наличию комплекса ростовых факторов.

Важно также отметить, что эффект введения экстракта сопровождался также признаками более раннего восстановления целостности скелетных мышц у крыс опытной группы. В пользу этого свидетельствовало то, что у животных данной группы в сыворотке крови на сроках наблюдения была ниже относительно контроля активность КФК, а к 90-м суткам после травмы активность фермента соответствовала уровню интактных животных.

Заключение. Проведенное исследование обнаружало, что введение мышечного экстракта, полученного из поврежденных скелетных мышц крыс (аллогенный материал), приводило к снижению ПА в мышцах, что способствовало более раннему восстановлению их целостности после моделирования синдрома сдавливания.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках темы государственного задания на осуществление научных исследований и разработок ФГБУ «НМИЦ ТО им. акад. Г. А. Илизарова» Минздрава России.

Литература/References

1. Лычагин А. В., Грицюк А. А., Корытин В. С. Лечение последствий ранений голени: продолжение развития технологии Илизарова. *Гений ортопедии*. 2022;28(1):69-75. [Lychagin A. V., Gritsyuk A. A., Korytin V. S. Treatment of tibial wound consequences: further development of the Ilizarov technology. *Genij Ortopedii*. – *Orthopaedic Genius*. 2022;28(1):69-75. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18019/1028-4427-2022-28-1-69-75>
2. Fernandez J. J., Smith S. R. Traumatic rhabdomyolysis: crush syndrome, compartment syndrome, and the 'found down' patient. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2024;32(4):e166-e174. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-23-00734>
3. Long B., Liang S. Y., Gottlieb M. Crush injury and syndrome: a review for emergency clinicians. *Am. J. Emerg. Med.* 2023;69:180-187. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2023.04.029>
4. Murata I., Imanari M., Komiya M., Kobayashi J., Inoue Y., Kanamoto I. Icing treatment in rats with crush syndrome can improve survival through reduction of potassium concentration and mitochondrial function disorder effect. *Exp. Ther. Med.* 2020;19(1):777-785. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8230>
5. Wang W., Wang Y., Yang J. Protective effects of ischemic postconditioning on skeletal muscle following crush syndrome in the rat. *Acta Cir. Bras.* 2021;36(7):e360701. <https://doi.org/10.1590/ACB360701.eCollection 2021>
6. Haruta Y., Kobayakawa K., Saiwai H., Hata K., Tamaru T. [et al.]. Zinc chelator treatment in crush syndrome model mice attenuates ischemia-reperfusion-induced muscle injury due to suppressing of neutrophil infiltration. *Sci. Rep.* 2022;12(1):15580. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19903-0>
7. Kobayashi J., Murata I. Nitrite as a pharmacological intervention for the successful treatment of crush syndrome. *Physiol. Rep.* 2018;6(5):e13633. <https://doi.org/10.14814/phy2.13633>
8. Li N., Wang X., Wang Y., Wang P., Sun N. [et al.]. Delayed step-by-step decompression with DSF alleviates skeletal muscle crush injury by inhibiting NLRP3/CASP-1/GSDMD pathway. *Cell Death Discov.* 2023;9(1):280. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01570-3>
9. Endo Y., Hwang C. D., Zhang Y., Olumi S., Koh D. J. [et al.]. VEGFA promotes skeletal muscle regeneration in aging. *Adv. Biol. (Weinh)*. 2023;7(10):e2200320. <https://doi.org/10.1002/adbi.202200320>
10. Gao H., Zhao Z., Li J., Guo Z., Zhang F. [et al.]. Platelet-rich plasma promotes skeletal muscle regeneration and neuromuscular functional reconstitution in a concentration-dependent manner in a rat laceration model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2023;672:185-192. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.05.123>
11. Graca F. A., Minden-Birkenmaier B. A., Stephan A., Demontis F., Labelle M. Signaling roles of platelets in skeletal muscle regeneration. *Bioessays*. 2023;45(12):e2300134. <https://doi.org/10.1002/bies.202300134>
12. Barbalho S. M., Prado Neto E. V., De Alvares Goulart R., Bechara M. D., Baisi Chagas E. F. [et al.]. Myokines: a descriptive review. *J. Sports Med. Phys. Fitness*. 2020;60(12):1583-1590. <https://doi.org/10.23736/S0022-4707.20.10884-3>
13. Waldemer-Streyer R. J., Kim D., Chen J. Muscle cell-derived cytokines in skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* 2022;289(21):6463-6483. <https://doi.org/10.1111/febs.16372>
14. Liu Y., Yu M., Chen L., Liu J., Li X. [et al.]. Systemic review of animal models used in the study of crush syndrome. *Shock*. 2022;57(4):469-478. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001911>
15. Ковинька М. А., Десятниченко К. С., Гребнева О. Л. Протеолитическая активность неколлагеновых белков, получаемых при диссоциативном экстрагировании костной ткани. *Гений ортопедии*. 1997;(3):35-37. [Kovin'-ka M. A., Desyatnichenko K. S., Grebneva O. L. Proteolytic activity of non-collagen proteins obtained by dissociative extraction of bone tissue. *Genij Ortopedii*. – *Orthopaedic Genius*. 1997;(3):35-37. (In Russ.)].

Поступила 26.03.2024

Сведения об авторах:

Стогов Максим Валерьевич, доктор биологических наук, доцент, руководитель отдела доклинических и лабораторных исследований; тел.: +73522450538, +79195976538; e-mail: stogo_off@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8516-8571>

Кононович Наталья Андреевна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник экспериментальной лаборатории; тел.: +73522415227, +79058529845; e-mail: n.a.kononovich@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5990-8908>

Киреева Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела доклинических и лабораторных исследований; тел.: +73522450538, +79195874887; e-mail: ea_tkachuk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1006-5217>