

УДК: 594: 094.3(262.5)

## Загальна антиоксидантна активність при алотрансплантації ембріональної м'язової тканини у щурів

О.В.Николаева, С.А.Петров

Алотрансплантація ембріональної тканини є одним з актуальних напрямків в сучасній теоретичній та медичній біохімії, який розробляється для стимуляції та відновлення функцій організму. Алотрансплантацію ембріональної тканини розглядають як можливу альтернативу традиційним, консервативним методам лікування, а також як методологічну основу експериментальних розробок. Метою роботи було дослідити вплив алотрансплантації ембріональної стегнової м'язової тканини на загальну антиоксидантну активність. Для алотрансплантації ембріональних м'язових тканин використовували ембріонів строком 2–3 тижні. Під ефірним наркозом в асептичних умовах тварину фіксували до хірургічної дошки у положенні лежачи на спині, операційне поле виголювали та тричі обробляли антисептиком. Розріз проводили по внутрішній середній третині стегна. У ембріонів вилучали стегнову м'язову тканину, яку фіксували лігатурою до стегна дорослого щура. Рану пошарово зашивали щільно вузловим швом. Використану алотрансплантацію проводили згідно з хірургічними правилами операцій на м'язах. Досліджувані показники визначались на першу, третю та сьому добу після операційного втручання в тканині донора і реципієнта. Підсадку сформованої тканини та удавану операцію проводили для того, щоб виключити дію як самої операції, так і ефекту підсадки тканини, і виявити дію ембріональної тканини на сформовану. Кожен показник ми досліджували не тільки при підсадці ембріональної тканини, але й при удаваній операції та підсадці сформованої тканини до сформованої та порівнювали аналогічні показники при всіх цих трьох видах втручання. Встановлені зміни ЗАА на третю добу дослідження алотрансплантації стегнової м'язової тканини ембріона свідчать про достовірне зниження загальної антиоксидантної активності в тканині реципієнта, що може бути пов'язане зі зривом антиоксидантного захисту, який характеризується розвитком вільнорадикальних пошкоджень різних компонентів клітини і тканин, що і є синдромом пероксидації, але на сьому добу антиоксидантні системи відновлюються.

**Ключові слова:** алотрансплантація, м'язова тканина, ембріональна тканина, загальна антиоксидантна активність.

## General antioxidant activity at the allotransplantation of embryonal muscle tissue in rats

O.V.Nikolaeva, S.A.Petrov

Allotransplantation of embryonal tissue is one of the actual directions in modern theoretical and medical biochemistry which is developed for stimulation and restoration of functions of the organism. Allotransplantation of the embryonal tissue is considered as possible alternative to traditional conservative methods of treatment, and also as methodological basis of experimental development. The purpose of the work was to investigate the effect of allotransplantation of the embryonic femoral muscle tissue on the general antioxidant activity. For allotransplantation of the embryonal muscle tissue 2–3 weeks' embryos were used. Under ether anesthesia in aseptic conditions the animal was fixed on surgical board in dorsal decubitus, the surgery field was shaved and processed by antiseptic agent three times. The section was carried out on internal average third of hip. Femoral muscle tissue was taken from embryos and then fixed by ligature to the hip of adult rat. The wound was sewn up layer-by-layer with densely noose suture. Used allotransplantation was carried out according to surgical rules of operations on muscles. The studied indicators were determined on the first, third and seventh days after the operative intervention in donor and recipient tissues. The implantation of the formed tissue and the false operation were performed in order to rule out the effect of both the operation itself and the effect of tissue implantation, in order to detect the effect of embryonic tissue on the formed. We examined each indicator not only when implanting the embryonic tissue, but also with the false operation and implantation of the formed tissue to the formed one, and compared the indices for all these three types of intervention. The established changes in the general antioxidant activity for the third day of the study of allotransplantation of the femoral muscle tissue of the embryo indicate a significant decrease in the overall antioxidant activity in the recipient's tissue, which may be due to the breakdown of antioxidant defense, characterized by the development of free radical damage to various components of the cell and tissues, which is a syndrome of peroxidation, but by the seventh day the antioxidant systems are restored.

**Key words:** allotransplantation, muscle tissue, embryonal tissue, general antioxidant activity.

## Общая антиоксидантная активность при аллотрансплантации эмбриональной мышечной ткани у крыс

Е.В.Николаева, С.А.Петров

Аллотрансплантация эмбриональной ткани является одним из актуальных направлений в современной теоретической и медицинской биохимии, которое разрабатывается для стимуляции и восстановления функций организма. Аллотрансплантация эмбриональной ткани рассматривается как возможная альтернатива традиционных консервативных методов лечения, а также в качестве методологической основы экспериментальных разработок. Целью работы было исследовать влияние аллотрансплантации эмбриональной бедренной мышечной ткани на общую антиоксидантную активность. Для аллотрансплантации эмбриональных мышечных тканей использовали эмбрионов сроком 2–3 недели. Под эфирным наркозом в асептических условиях животное фиксировали к хирургической доске в положении лежа на спине, операционное поле выбривали и трижды обрабатывали антисептиком. Разрез проводили по внутренней средней трети бедра. У эмбрионов изымали бедренную мышечную ткань, которую фиксировали лигатурой к бедру взрослой крысы. Рану послойно зашивали плотно узловым швом. Описанную аллотрансплантацию проводили согласно с хирургическими правилами операций на мышцах. Исследуемые показатели определялись на первые, третьи и седьмые сутки после оперативного вмешательства в ткани донора и реципиента. Подсадку сформированной ткани и ложную операцию проводили для того, чтобы исключить действие как самой операции, так и эффекта подсадки ткани, для того чтобы выявить действие эмбриональной ткани на сформированную. Каждый показатель мы исследовали не только при подсадке эмбриональной ткани, но и при ложной операции и подсадке сформированной ткани к сформированной, и сравнивали исследуемый показатель при всех этих трех видах вмешательства. Установленные изменения общей антиоксидантной активности на третьи сутки исследования после аллотрансплантации бедренной мышечной ткани эмбриона свидетельствуют о достоверном снижении общей антиоксидантной активности в ткани реципиента, что может быть связано со срывом антиоксидантной защиты, характеризующимся развитием свободнорадикальных поврежденных различных компонентов клетки и тканей, что и является синдромом перекисидации, но к седьмым суткам антиоксидантные системы восстанавливаются.

**Ключевые слова:** аллотрансплантация, мышечная ткань, эмбриональная ткань, общая антиоксидантная активность.

### Вступ

Терапія за допомогою ембріональних тканин включає в себе специфічні та неспецифічні механізми, які ґрунтуються на модуляції процесів регенерації, репарації, проліферації та диференціювання і реалізуються на генетичному та епігеномному рівнях. Розкриття цих механізмів може бути вирішальною умовою для розробки нових методів терапії патологічних станів, пов'язаних із порушенням морфогенезу і, насамперед, онкологічних захворювань (Репин, 1996). Алотрансплантація ембріональної тканини є одним з актуальних напрямків в сучасній теоретичній та медичній біохімії, який розробляється для стимуляції та відновлення функцій організму (Шумаков и др., 2002). Алотрансплантацію ембріональної тканини розглядають як можливу альтернативу традиційним, консервативним методам лікування, а також як методологічну основу експериментальних розробок (Станков и др., 2003). Оксидативний стрес виникає внаслідок надмірного надходження в організм активних форм кисню (Почерняева и др., 2005; Овсянникова та ін., 2007). При цьому розвивається комплекс неспецифічних змін метаболізму. Окислювальний стрес є важливим модулятором регенерації скелетних м'язів після травми. Делікатний баланс між експресією активних форм кисню та експресією й активністю антиоксидантних ферментів відіграє важливу роль в підтримці м'язового гомеостазу. Вважається, що антиоксидантні ферменти беруть участь в регуляції фіброзу скелетних м'язів. Передбачається, що посилений окислювальний стрес є основним механізмом ушкодження м'язів. Профілактика окислювального стресу розглядається як мета для терапевтичного лікування м'язової дистрофії. Проте через складність вивчення ролі окислювального стресу в підтримці м'язового гомеостазу ще багато питань потребують подальшого дослідження, щоб пояснити точну роль окислювального стресу в м'язовій регенерації (Kozakowska et al., 2015).

Мета дослідження – визначити загальну антиоксидантну активність (ЗАА) при алотрансплантації ембріональної м'язової тканини у щурів.

### Матеріали та методи досліджень

Для алотрансплантації ембріональних м'язових тканин використовували ембріонів строком 2–3 тижні. Під ефірним наркозом в асептичних умовах тварину фіксували до хірургічної дошки у положенні лежачи на спині, операційне поле виголювали та тричі обробляли антисептиком (йодобак). Розріз проводили по внутрішній середній третині стегна. У ембріонів вилучали стегову м'язову тканину, яку фіксували лігатурою до стегна дорослого щура. Рану пошарово зашивали щільно вузловим швом (Лебедева и др., 2014; Тесевич, Барьяш, 2010). Використану алотрансплантацію проводили згідно з хірургічними правилами операцій на м'язах (Литтманн, 1985). Трансплантацію м'язової тканини, взятої у тварин з одного посліду, проводили по такій самій схемі, як і алотрансплантацію. Донором стегової та черевної м'язової тканини слугували щури-самці з одного посліду.

Удавану операцію проводили для порівняння впливу хірургічного втручання на досліджувані показники. Контролем слугувала м'язова тканина щура, яка не підлягала хірургічним втручанням.

Ми використовували ці методичні прийоми для того, щоб виключити дію як самої операції, так і ефекту підсадки тканини, для того щоб виявити дію ембріональної тканини на сформовану. Тому кожен показник досліджували не тільки при підсадці ембріональної тканини, але й при удаваній операції та підсадці сформованої тканини до сформованої та порівнювали аналогічні показники при всіх цих трьох видах втручання. У роботі строго дотримувались етичних принципів проведення експериментальних досліджень з урахуванням положень Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1998) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тварин виводили з експерименту шляхом пропускання електричного струму через довгастий мозок. Досліджувані показники визначали на першу, третю та сьому добу після операційного втручання в тканині донора і реципієнта. ЗАА визначали за методом, який заснований на визначенні малонового діальдегіду, як продукту окислення твіну-80 при інгібуванні аскорбатом. Проводили статистичний аналіз отриманих даних за Стьюдентом.

### Результати та обговорення

З табл. 1 видно, що удавана операція призводить до збільшення загальної антиоксидантної активності в досліджуваних тканинах в ранні строки дослідження відносно контролю. На сьому добу дослідження загальна антиоксидантна активність перевищувала контрольний показник, але відмінності не є статистично значущими. Можна припустити, що удавана операція призводить до підвищення антиоксидантного статусу в тканинах.

Таблиця 1.

Визначення ЗАА при удаваній операції,  $M \pm m$  (ммоль МДА/г тканини)

Доба	Тканина	Стегова м'язова тканина дорослого щура
Контроль (без підсадки)		$0,15 \pm 0,02$
1 доба		$0,30 \pm 0,01^*$ , $p < 0,01$
3 доба		$0,33 \pm 0,02^*$ , $p < 0,01$
7 доба		$0,19 \pm 0,01$ , $p > 0,05$

Примітка: \*статистично значуще відносно контролю.

В наступній серії досліджень ми визначали загальну антиоксидантну активність в стеговій м'язовій тканині при трансплантації м'язової тканини, взятої у щурів з одного посліду, на першу, третю та сьому добу дослідження.

Загальна антиоксидантна активність при трансплантації стегової та черевної м'язових тканин, взятих у щурів з одного посліду, збільшується як в тканинах донора, так і в тканинах реципієнта, що свідчить про появу токсичних сполук кисню в тканинах та активне включення антиоксидантного захисту клітин (табл. 2). Передбачається, що посилений окислювальний стрес є основним механізмом ушкодження м'язів. В якості маркера захворювання можна використати підвищену експресію антиоксидантних ферментів (Saclier et al., 2013; Singh et al., 2014).

Таблиця 2.

Визначення ЗАА при трансплантації м'язової тканини, взятої у щурів з одного посліду,  $M \pm m$  (ммоль МДА/г тканини)

Доба \ Тканина	Стегнова м'язова тканина реципієнта	Стегнова м'язова тканина донора
Контроль (без підсадки)	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02
1 доба	0,22 ± 0,01*, $p < 0,05$	0,23 ± 0,01*, $p < 0,01$
3 доба	0,17 ± 0,02	0,27 ± 0,02*, $p < 0,01$
7 доба	0,33 ± 0,01*, $p < 0,01$	0,31 ± 0,01*, $p < 0,01$

Примітка: \*статистично значуще відносно контролю.

В стегновій м'язовій тканині дорослого щура ЗАА майже в 2 рази перевищує її активність в стегновій м'язовій тканині ембріона (табл. 3), алотрансплантація стегнової м'язової тканини ембріона призвела до зниження ЗАА на третю добу дослідження відносно контролю (в 2 рази). В стегновій м'язовій тканині ембріона ЗАА збільшується на сьому добу дослідження відносно контролю (в 3 рази). При порівнянні ЗАА між стегновими м'язовими тканинами донора та реципієнта, можна відмітити, що на сьому добу дослідження ЗАА донора в 2,5 рази перевищує її активність в тканині реципієнта.

Таблиця 3.

Визначення ЗАА при алотрансплантації ембріональної м'язової тканини,  $M \pm m$  (ммоль МДА/г тканини)

Доба \ Тканина	Стегнова м'язова тканина дорослого щура (реципієнт)	Стегнова м'язова тканина ембріона (донор)
Контроль (без підсадки)	0,15 ± 0,02**, $p < 0,05$	0,08 ± 0,02
1 доба	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01
3 доба	0,07 ± 0,01*, $p < 0,05$	0,06 ± 0,01
7 доба	0,10 ± 0,03**, $p < 0,1$	0,25 ± 0,03*, $p < 0,01$

Примітка: \*статистично значуще відносно контролю; \*\*статистично значуще при порівнянні м'язових тканин дорослого щура та ембріона.

Профілактика окислювального стресу розглядається як мета для терапевтичного лікування м'язової дистрофії. Причетність окислювального стресу до м'язового гомеостазу потребує подальшого дослідження, щоб пояснити точну роль окислювального стресу в м'язовій регенерації (Gierer et al., 2010; Ghaly, Marsh, 2010).

Таким чином, на першу добу дослідження алотрансплантація стегнової м'язової тканини ембріона не призводить до достовірних змін загальної антиоксидантної активності в тканині реципієнта, тим саме залишає її приблизно на рівні контрольних значень (рис. 1). На третю добу дослідження алотрансплантація стегнової м'язової тканини ембріона призводить до достовірного зниження загальної антиоксидантної активності в тканині реципієнта, що може свідчити про зрив антиоксидантного захисту, який характеризується розвитком вільнорадикальних пошкоджень різних компонентів клітини і тканин, що складають синдром пероксидації, та включає наступні зміни: пошкодження мембран; інактивацію або трансформацію ферментів; пригнічення поділу клітин; накопичення в клітині інертних продуктів полімеризації. На сьому добу дослідження алотрансплантація стегнової м'язової тканини ембріона призвела до стабілізації загальної антиоксидантної активності, залишаючи її в межах контрольних значень.

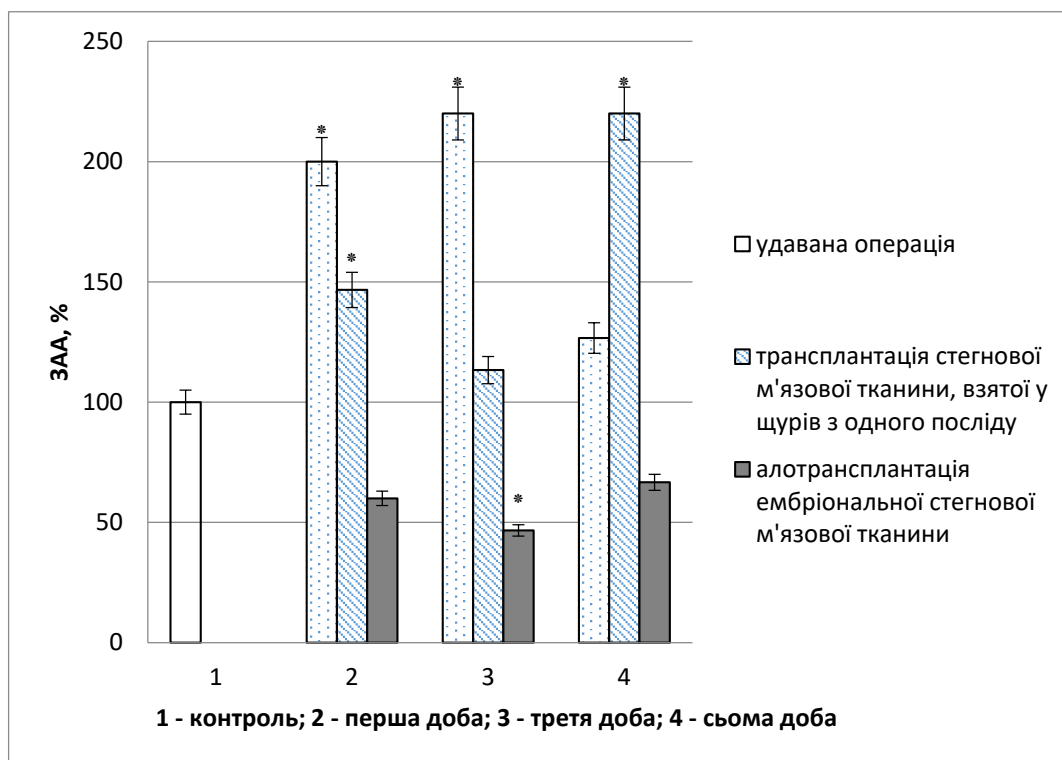


Рис. 1. Динаміка загальної антиоксидантної активності (%) в стегновій м'язовій тканині дорослого щура, після хірургічних втручань

Примітка: \* $p \leq 0,05$  – статистично значуще відносно контролю.

#### Висновки

Встановлені зміни загальної антиоксидантної активності на третю добу дослідження алотрансплантації стегнової м'язової тканини ембріона свідчать про достовірне зниження загальної антиоксидантної активності в тканині реципієнта, що може бути пов'язане зі зривом антиоксидантного захисту, який характеризується розвитком вільнорадикальних пошкоджень різних компонентів клітини і тканин, що і є синдромом пероксидації, але на 7 добу антиоксидантні системи відновлюються.

#### Список літератури / References

- Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Щербаков Д.А. Регенерация скелетной мышечной ткани экспериментальных животных, индуцированная биоматериалом Аллоплант // International Journal of Experimental Education. – 2014. – С. 68–71. /Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Mussina L.A., Shcherbakov D. A. Regeneration of skeletal muscle tissue of experimental animals induced by biomaterial Alloplant // International Journal of Experimental Education. – 2014. – No. 3. – P. 68–71./
- Литтманн И. Оперативная хирургия. – Будапешт: Издательство академии наук Венгрии, 1985. – С. 1055–1056. /Littmann I. Operative surgery. – Budapest: Publishing house of the Academy of Sciences of Hungary, 1985. – P. 1055–1056./
- Овсянникова Л.М., Чумак А.А., Коваленко О.М. та ін. Антиоксидантна система, окисна модифікація білків і ліпідів в розвитку порушень життєдіяльності у віддаленому періоді після Чорнобильської аварії // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції. – К.: ДІА, 2007. – С. 422–436. /Ovsyannikova L.M., Chumak A.A., Kovalenko O. M. et al. Antioxidant system, oxidative modification of proteins and lipids in development of life activity disturbances in the remote period after Chernobyl accident // Medical effects of accident on Chernobyl nuclear power station. – Kyiv.: DIA, 2007. – P. 422–436./
- Почерняева В.Ф., Цебржинский О.И., Шиш Н.В. Определение источников активных форм кислорода // Буковинський медичний вісник. – 2005. – Т.9, №2. – С. 214–215. /Pochernyaeva V.F., Tsebrzhinsky O.I., Shish N.V. Definition of reactive oxygen species sources // Bukovinian Medical Herald Journal. – 2005. – Vol.9, no. 2. – P. 214–215./

- Репин В.С. Медицинская клеточная биология: новые фундаментальные и прикладные исследования // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. – М., 1996. – С. 19–27. /Repin V.S. Medical cell biology: new basic and applied researches // Transplantation of fetal tissues and human cells. – Moscow, 1996. – P. 19–27./
- Станков Д.С., Катунян П.И., Крашенинников Н.Е. Нейротрансплантация в лечении травмы спинного мозга // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. – №1. – С. 44–45. /Stankov D.S., Katunyan P.I., Krasheninnikov N.E. Neurotransplantation in treatment of spinal cord injury // Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. – 2003. – No. 1. – P. 44–45./
- Тесевич Л.И., Барьяш В.В. Пластическое возмещение дефектов и деформаций челюстно-лицевой области свободной пересадкой тканей. – Минск: БГМУ, 2010. – 63с. /Tesevich L.I., Baryash V.V. Plastic compensation of defects and deformations of maxillofacial area by free tissue grafting. – Minsk: BSMU, 2010. – 63p./
- Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников Н.Е. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2002. – №4. – С. 3–6. /Shumakov V.I., Onishchenko N.A., Krasheninnikov N.E. Bone marrow as source for receiving mesenchymal cells // Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. – 2002. – No. 4. – P. 3–6./
- Ghaly A., Marsh D.R. Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury // Exp. Gerontol. – 2010. – Vol.45. – P. 381–388.
- Gierer P., Rother J., Mittlmeier T. et al. Ebselen reduces inflammation and microvascular perfusion failure after blunt skeletal muscle injury of the rat // J. Trauma. – 2010. – Vol.68. – P. 853–858.
- Kozakowska M., Pietraszek-Gremplewicz K., Jozkowicz A., Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes // J. Muscle Res. Cell Motil. – 2015. – Vol.36 (6). – P. 377–393.
- Saclier M., Cuvellier S., Magnan M. et al. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration // FEBS J. – 2013. – Vol.280. – P. 4118–4130.
- Singh S., Canseco D.C., Manda S.M. et al. Cytoglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – Vol.111. – P. 129–138.

**Представлено: А.П.Левицький / Presented by: A.P.Levytsky**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 09.10.2018*

**About the authors:** E.V.Nikolaeva – Odessa National Medical University, Valikhovsky Lane, 2, Odessa, Ukraine, 65028, evkulibaba@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2098-816X>

S.A.Petrov – Odessa I.I.Mechnikov National University, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, Ukraine, 65082, serpet2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9390-4006>

**Про авторів:** О.В.Ніколаєва – Одеський національний медичний університет, Валіховський провулок, 2, Одеса, Україна, 65028, evkulibaba@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2098-816X>

С.А.Петров – Одеський національний університет імені І.І.Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082, serpet2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9390-4006>

**Об авторах:** Е.В.Николаева – Одесский национальный медицинский университет, Валиховский переулок, 2, Одесса, Украина, 65028, evkulibaba@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2098-816X>

С.А.Петров – Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082, serpet2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9390-4006>