

Роль макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани лабораторных животных, индуцированной биоматериалом Аллоплант

А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, Е.М. Гареев

ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, Уфа

Контактная информация: к.б.н. Лебедева Анна Ивановна, jeol02@mail.ru

С целью восстановления дефекта скелетной мышечной ткани применялся аллогенный губчатый биоматериал (АГБ). Использовались гистологические, иммуногистохимические и электронномикроскопические методы исследования. Применение АГБ при глубоком повреждении мышцы голени крысы способствовало полноценному восстановлению дефекта. Продукты биodeградации биоматериала являются хемоттактантом для резидентных макрофагов (CD68) и стимулируют их фенотипическое созревание, что определяет исход регенерации. В группе животных без использования биоматериала в процессе заживления дефекта наблюдался дефицит CD68 клеток и их функциональная инактивация. Результатом чего являлось образование рубца с дальнейшим перерождением в жировую ткань.

Ключевые слова: регенерация, скелетная мышца, макрофаг, биоматериал Аллоплант.

Проблема посттравматического восстановления скелетных мышц до сих пор остается актуальной. Как правило, заживление заканчивается формированием грубоволокнистого фиброзного рубца, что приводит к нарушению функционирования органа. Одним из наиболее успешно развивающихся направлений в регенеративной медицине является использование биodeградируемых трансплантатов различного происхождения. Весомую роль в биodeградации трансплантатов и ремоделировании скелетной мускулатуры выполняют клетки системы мононуклеарных фагоцитов [12, 15].

Целью исследования явилось определение ультраструктурных особенностей макрофагов и их количественной динамики при регенерации скелетной мышечной ткани после применения аллосухожильного губчатого биоматериала (АГБ).

Материалы и методы

Для исследования использовали половозрелых аутбредных крыс линии Wistar обоего пола массой 0,18-0,2 кг. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАМН.

Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.77), «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого

обращения» от 01.01.1997 г. Животные содержались в одинаковых стандартных конвенциональных условиях, в пластиковых клетках с автопоилками, получали гранулированный полноценный комбикорм ПКЗ-92 и очищенную водопроводную воду без ограничений. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев.

Работу проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13 ноября 1984 г. № 724). В опытной серии (n=36) после разреза кожных покровов на задней поверхности голени производилось выделение икроножной мышцы и пяточного сухожилия, а также малоберцового нерва, который не повреждали. Затем на брюшко мышцы в средней трети наносился дефект длиной 3–4 мм. В толщу между проксимальной и дистальной культями укладывался АГБ соответствующих размеров и фиксировался нитевидным сухожильным трансплантатом. В контрольной серии (n=36) в области икроножной мышцы был нанесен дефект длиной 3–4 мм. Малоберцовый нерв не повреждали. После чего на кожу накладывали швы Vicryl 6-0. Из опыта животные выводились путем инсuffляции летальной дозы паров раствора фторотана. Забор биопсийного материала проводили через 3, 7, 14, 30, 60 и 90 суток после эксперимента. АГБ был изготовлен в данном случае из сухожилий крысы и обработан методом лиофилизации, что позволяет добиться модификации структуры в губчатую форму с увеличением объема в 6 раз. Нитевидный сухожильный трансплантат также был аллогенного происхождения, изготовлен из сухожилия крысы и пред-

ставлял собой нить, которая применялась для фиксации трансплантируемого АГБ к культям мышцы. Все трансплантаты были обработаны по оригинальной запатентованной технологии Аллоплант, разработанной в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ (Патент РФ на изобретение № 189257, ТУ 9398-001-04537642-2011).

Гистологические срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, по Маллори. Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах толщиной 4 мкм. Для этого биопсийный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия). Окраску проводили на автоматизированном стайнере для иммуногистохимии и гибридизации *in situ* Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первичных поликлональных антител применяли CD68 в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, США). CD68 (высокогликозилированный трансмембранный гликопротеин, локализующийся в лизосомах). Экспрессия молекулы CD68 является маркером моноцитов/макрофагов и представляет собой гомолог мышинового макросиалина, члена семейства LAMP (лизосом-ассоциированных мембранных протеинов). Локализована преимущественно в мембране поздних эндосом [11]. Кроме того, показано, что данная молекула процессирует антиген путем постепенного ферментного расщепления фагоцитируемых клеткой объектов [9]. Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биоти-

новую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первичных антител. Подсчет клеток производили в 20-ти полях зрения каждого образца ($n=6$) при увеличении $\times 400$. После проведения иммуногистохимической реакции срезы заключали в синтетическую среду Bio Mount (Bio Optica, Италия).

Все микроскопические исследования проводились с использованием светового микроскопа AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и морфометрической программой анализа изображений Axiovision (C. Zeiss, Германия) и светового микроскопа со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения Leica DMD 108 (Германия).

Для электронно-микроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, приготовленном на какодилатном буфере (рН 7,2-7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO_4 на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим на 2,5% растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 kV.

Для обработки полученных числовых данных использовали параметрический дисперсионный анализ по Р. Фишеру при помощи критерия Fd [4, 6] и непараметрический (ранговый) дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису с использованием для сравнения отдельных выборок рангового критерия Манна-Уитни [4, 6, 8].

Результаты исследований

В контрольной группе в начальные сроки эксперимента в ране обнаруживались очаги острого воспаления и кровоизлияния. Резецированные мышечные волокна подвергались деструктивным изменениям. Пролиферативная стадия (7-14 суток) характеризовалась развитием грануляционной ткани, представленной толстыми фуксинофильными пучками коллагеновых волокон, инфильтрированных соединительнотканными и иммуногенными клетками – лимфоцитами. Среди клеток соединительной ткани преобладали клетки фибробластического ряда: мезенхимные клетки, юные фибробласты, фибробласты с активной коллагенсинтетической деятельностью (коллагенобласты II типа), в также лимфоциты и макрофагальные клетки. Определялись макрофаги секреторного и фагоцитарного типов. Причем, фагоцитарные макрофаги обнаруживались с признаками функционального истощения и перенапряжения ультраструктур. В округлом ядре гетерохроматин конденсировался вдоль кариолеммы. Цитоплазма была заполнена большим количеством разнокалиберных осмиофильных вторичных телец и фагоцитарных вакуолей. Митохондрии были набухшие, округлой формы, в просветленном матриксе выявлялись разрушенные кри-

сты. Укороченные каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума были вакуолизированы. В светлой цитоплазме обнаруживались единичные рибосомы в малом количестве, цитоскелет был представлен тоно- и микрофиламентами. Цитолемма – с локальными разрушениями (рис. 1). В грануляционной ткани отмечался скудный васкулярный рисунок. Резецированные мышечные волокна запечатывались коллагеновыми волокнами за счет наплыва сарколеммы.

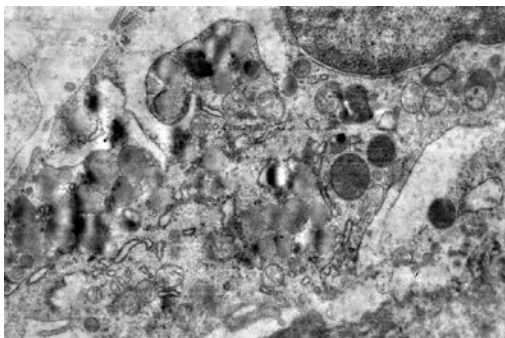


Рис. 1. Фагоцитарный макрофаг с признаками функционального истощения через 7 суток после нанесения дефекта скелетной мышечной ткани. Электронограмма. Увеличение $\times 15000$.

Через 21 сутки макрофагальные клетки трансформировались в эпителиоидные. Длинные тонкие выросты цитолеммы образовывали интердигитации, посредством которых они взаимодействовали друг с другом, а в дальнейшем объединялись в функционально инертные гигантские клетки инородных тел (рис. 2). В зоне дефекта грануляционная ткань замещалась плотной волокнистой соединительной тканью, в которой обнаруживались жировые капли. Спустя 30 суток в области дефекта обнаружился регенерат, состоящий из мышечной, плотной волокнистой соединительной и жировой тканей (рис. 3).

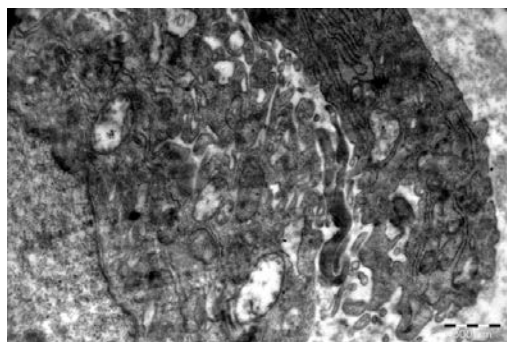


Рис. 2. Скопление макрофагальных клеток. Эпителиоидная и гигантская клетка инородных тел. Через 21 сутки после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Электронограмма. Увеличение $\times 6000$.

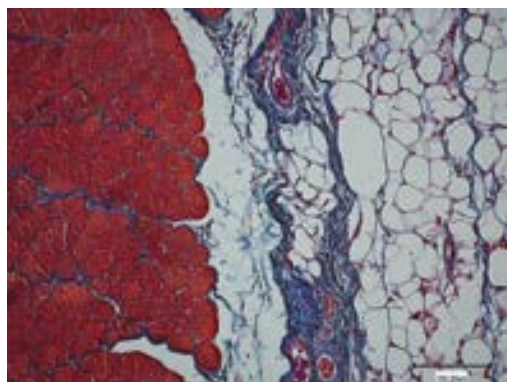


Рис. 3. Жировое перерождение соединительной ткани через 30 суток после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Окраска по Маллори.

В опытной группе через трое суток после пересадки АГБ в паратравматической зоне обнаруживались дилатация и повышенная проницаемость кровеносных сосудов, нейтрофильная инфильтрация, отек межпучковых пространств, разрушения миоцитов, кровоизлияния. В зоне трансплантата выявлялся фуксинофильный тканевый экссудат, пронизанный фибриновыми нитями в виде тонковолокнистой сети. Проницаемость кровеносных сосудов способствовала клеточной элимина-

ции, набуханию и ферментативному воздействию на трансплантат. Через 7 суток воспалительная инфильтрация в реактивной зоне и в самом трансплантате замещалась на макрофагально-фибробластическую на фоне развитой рыхлой сети тонких коллагеновых волокон. Выявлялись фибробласты с умеренно расширенными каналами гранулярного эндоплазматического ретикулума и классифицировались как коллагенобласты I типа – клетки с умеренным синтезом коллагена. Выявлялись отростчатые макрофаги преимущественно фагоцитарного типа, которые контактировали с клетками фибробластического ряда. Округлое ядро макрофагов было заполнено мелкозернистым эухроматином. В цитоплазме выявлялись короткие каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума, округлые митохондрии с затемненным матриксом и параллельно ориентированными четкими кристами, цистерны комплекса Гольджи, многочисленные свободные рибосомы, фагосомы и вакуоли (рис. 4).

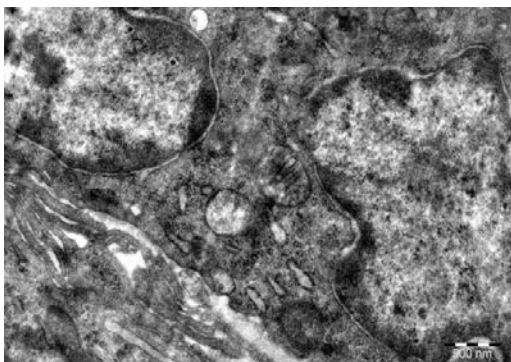


Рис. 4. Макрофаг фагоцитарного типа во взаимодействии с фибробластом через 14 суток после имплантации в скелетную мышцу крысы АГБ. Электронограмма. Увеличение $\times 6000$.

Наряду с соединительнотканными клетками обнаруживались малодифференцированные клетки без определенной специализации, а также клетки миогенной дифференциации – миосателлиты II типа и миобласты. После лизиса и резорбции балок АГБ макрофагами происходило постепенное разрастание обильно васкуляризированной рыхлой неоформленной соединительной ткани. Спустя 14 суток выявлялось замещение АГБ от периферии по всей ее площади. Наблюдались признаки формирования мышечно-соединительнотканного регенерата с преобладанием рыхлой соединительной ткани, инфильтрированной фибробластами и многочисленными макрофагами (рис. 5). Строму сопровождала обильная сеть гемокapилляров, свободные миоциты, образующие почки роста и тяжи новообразованных тонких мышечных волокон.

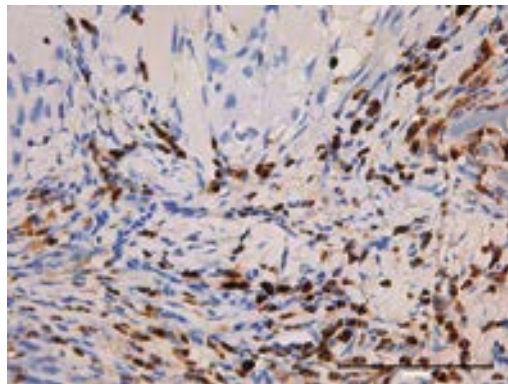


Рис. 5. Массивная инвазия $CD68^+$ макрофагов в реактивной зоне через 14 суток после имплантации в скелетную мышцу крысы АГБ. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления $CD68^+$ клеток с докраской гематоксилином.

Через 30 суток в очаге трансплантации обнаруживался мышечно-соединительнотканый регенерат с

преобладанием мышечной ткани. Пространственная ориентация растущих миосимпластов была параллельна балкам предсуществующего биоматериала. Через 60-90 суток регенерат был представлен пучками мышечных волокон, окутанных эндо- и перимизием (рис. 6).

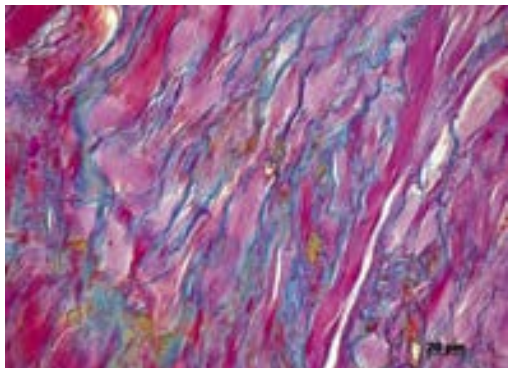


Рис. 6. Новообразованная мышечная ткань в зоне трансплантации АГБ спустя 90 суток. Параллельно ориентированные пучки мышечных волокон окутаны эндо- и перимизием. Окраска по Маллори.

Численность CD68⁺ клеток в контрольной и опытной группах в начальные сроки эксперимента (3 суток) практически находилась на одном уровне: 61 ± 29 ($p > 0,60$) и 67 ± 28 ($\eta^2 = 22\%$, $F = 18,2$, $p < 0,001$), критерий Манна-Уитни составлял $Z = 0,79$, $p > 0,43$ соответственно. Через 7 суток после применения АГБ доля CD68⁺ удваивалась до 115 ± 21 клеток ($p < 0,0002$), в то время как в контрольной группе численность данных клеток была достоверно ниже, в 1,5 раза (75 ± 32 , $p < 0,001$). По мере заживления дефекта в скелетной мышечной ткани число клеток параллельно снижалось. Причем, после применения АГБ CD68⁺ клетки обнаруживались в период 30-90 суток ($9 \pm 9 - 1,6 \pm 1,6$, $\eta^2 = 14\%$, $F = 5,8$, $p < 0,005$), а в контроле отсутствовали ($1 \pm 0,5$, $\chi^2 = 15,2$, $p < 0,002$) (рис. 7).

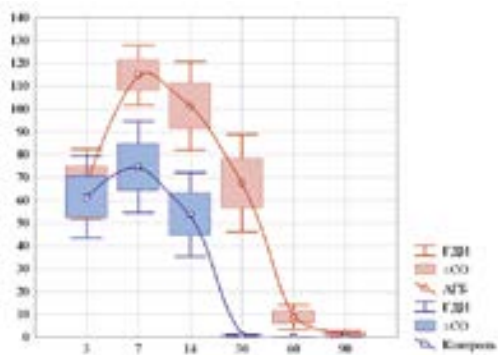


Рис. 7. Динамика численности CD68⁺-клеток после применения АГБ и в контроле. По оси абсцисс – сроки наблюдения в днях. По оси ординат – среднее число клеток. ГДИ – границы доверительного интервала для средних, $\pm CO$ – стандартная ошибка среднего значения.

Обсуждение результатов

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в контрольной группе животных стадия острого воспаления трансформировалась в фазу пролиферации с образованием гранулематозной ткани, в которой наиболее усиленной является деятельность фибробластов. Выраженная фибробластическая реакция и дифференциация их в коллагенобласты II типа инициирует усиленное коллагенообразование. Дефицит и фенотипическая незрелость макрофагов способствует незавершенному фагоцитозу и привлечению иммунокомпетентных клеток, дифференциации в неактивные гигантские формы с низкой фагосекреторной активностью. Выявленные скопления эпителиоидных клеток можно расценить как признак развития компенсаторно-адаптивной клеточной реакции, выражающейся в гипертрофии макрофагов. Последующая их трансформация в гигантские клетки инородных тел свидетельствует

о развитии гранулематозного воспаления, исходом которого является фиброзирование дефекта и развитие рубца [3]. Ишемия тканей, развившаяся из-за редукции гемокапилляров, также может способствовать распаду мышечных волокон и их массовой гибели, что также провоцирует развитие фиброза [1].

Биоматериалы Аллоплант изготавливаются из волокнистых соединительнотканых кадаверных тканей. При биодеградации биоматериала Аллоплант происходит дозированная элиминация коллагена, протеогликанов и гликозаминогликанов, основную долю которых составляет гиалуроновая кислота [7]. В опытной группе животных при замещении АГБ у реципиента формируется соединительнотканно-мышечный регенерат, где доля собственной органотипической рыхлой волокнистой соединительной ткани со временем снижается за счет ее замещения мышечной. Макрофагальная реакция в начальные сроки эксперимента (3-е суток) не отличается от контрольных значений и является признаком острого воспаления, обусловленного оперативным вмешательством. Спустя 7 суток динамика роста количества CD68⁺-клеток значительно превосходит контрольные значения, т.к. продукты биодеградации АГБ являются хемоаттрактантами для резидентных макрофагов и способствуют их фенотипическому созреванию в клетки фагоцитарного типа. По мере резорбции биоматериала и ремоделирования регенерата численность макрофагальных клеток снижается. В многочисленных исследованиях, касающихся регенерации скелетной мышечной ткани, им отводится большое значение как клеткам, определяющим репаративную эф-

фективность [14, 15]. Активированные макрофаги, в свою очередь, влияют на фенотип фибробластов и ингибируют избыточный синтез коллагена [5].

По некоторым данным, макрофаги также способствуют успешному приживлению миогенных клеток предшественников в раннем периоде заживления скелетной мускулатуры [10, 13, 14]. В опытной группе животных происходит ранняя активация миосателлитов и их дифференциация в зрелые миоциты. Новообразованные миосимплеты сопровождают коллагеновые волокна и свободно проникают между ними. За счет удлинения и гипертрофии мышечных волокон они постепенно вытесняют новообразованную рыхлую соединительную ткань на периферию мышечного пучка. Так формируется эндомизий и перимизий. В данном случае соединительная ткань выступает «в качестве источника индукционно-формативной тканевой регуляции», а мышечная ткань является регулируемой системой [2].

Выводы

После глубокого повреждения скелетной мышечной ткани выявляется дефицит CD68⁺-клеток и их функциональная инактивация. Вследствие чего развивается процесс хронического воспаления и рубцевания дефекта с дальнейшим перерождением в жировую ткань. В противовес этому, при замещении дефекта в мышце аллогенным губчатым биоматериалом продукты его резорбции стимулируют усиленную миграцию фенотипически зрелых CD68⁺-макрофагов к очагу повреждения, что способствует полноценному миогенезу.

Список литературы

1. Данилов Р.К. Раневой процесс: гистогенетические основы. – СПб: ВМедА им. С.М. Кирова. 2008. 308 с.
2. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей. – Л.: Медицина. 1984. 232 с.
3. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза // Биомедицина. № 4. 2013. С. 114-123,
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера. 2002. 312 с.
5. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. – М.: Медицина. 1981. С. 312.
6. Халфин А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных. – М.: ООО «Бином-Пресс». 2008. 512 с.
7. Хасанов Р.А. Инъекционная форма аллотрансплантатов серии «Аллоплант». Получение, анализ и биологическая активность: Автореф. дисс. ... к.фарм.н. – Пермь. 1999. 24 с.
8. Холлендер М., Вульф Д. Непараметрические методы статистики. – М.: Финансы и статистика. 1983. 518 с.
9. Holness C.L., da Silva R.P., Fawcett J., Gordon S., Simmons D.L. Macrophage, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9661-9666.
10. Lesault P.F., Theret M., Magnan M., et al. Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cell into MDX skeletal muscle // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. 46698 p.
11. Linehan S.A. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs // BMC Immunol. 2005. V. 6. P. 1471-1477.
12. Novak M.L., Weinheimer-Haus E.M., Koh T.J. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury // J. Pathol. 2014. V. 232. № 3. P. 344-355.
13. Segawa M., Fucada S., Yomamoto Y.H., et al. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis // Experimental cell research. 2008. V. 314. P. 3232-3244.
14. Stefater J.A., Ren S., Lang R.A., Duffield J.S. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration // Trends Mol. Med. 2011. V. 17. № 12. P. 743-752.
15. Wang H., Melton D.W., Porter L., et al. Altered macrophage phenotype transition impairs skeletal muscle regeneration // Am J. Pathol. 2014. V. 184. № 4. P. 1167-1184.

The role of macrophages in the regeneration of skeletal muscle tissue laboratory animals, induced by the Alloplant biomaterial

A.I. Lebedeva, S.A. Muslimov, L.A. Musina, E.M. Gareev

In order to restore defect skeletal muscle tissue was used allogeneic spongy biomaterial (AGB). Used histological, immunohistochemical and electron microscopic methods. The use of AGB in a deep damage to the muscles of the calf rats contributed to a full restoration of the defect. The products of biodegradation of biomaterial are chemoattractant for resident macrophages (CD 68) and stimulate their phenotypic maturation that determines the outcome of regeneration. In the group of animals without the use of biomaterial in the healing process of the defect were scarce CD 68 cells and their functional inactivation. The result was the formation of a scar with a further degeneration in the adipose tissue.

Key words: regenerate skeletal muscle, the macrophage, the Alloplant biomaterial.