

Биоматериал Аллоплант при регенерации миометрия рога матки экспериментальных животных – стимулятор макрофагов мезенхимного происхождения

А.И. Лебедева

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

Контактная информация: к.б.н. Лебедева Анна Ивановна, Jeol02@mail.ru

В дефект миометрия рога матки крысы был имплантирован биоматериал Аллоплант (БМА). В результате формировался полноценный структурный регенерат, состоящий из кластеров лейомиоцитов и прослоек волокнистой соединительной ткани. Регенерация происходила с привлечением макрофагов М1 мезенхимного происхождения, содержащих гликозаминогликаны. В контрольной группе в зоне дефекта без применения БМА выявлялся дефицит макрофагов, происходило формирование грубого рубца. Морфологическое исследование проводили с применением гистологических (окраска гематоксилином и эозином, по Ван Гизону), гистохимических (окраска по Хейлу) и иммуногистохимических (vimentin, CD68, IL1, FGF1, TGFβ1) методов.

Ключевые слова: биоматериал Аллоплант, макрофаги, миометрий рога матки, регенерация.

Введение

В ранее опубликованных статьях были освещены аспекты регенерации миометрия рога матки самок кроликов, индуцированных биоматериалом Аллоплант (БМА) [5, 4]. Выявлено, что после имплантации БМА происходила резорбция частиц биоматериала и замещение их рыхлой соединительной тканью с высокой степенью васкуляризации. Происходила пролиферация малых гладкомышечных клеток – лейомиоцитов. В миометрии экспериментальной группы доля паренхимы доминировала над стромальным компонентом. В контрольной группе животных без применения биоматериала на фоне дефицита макрофагов наблюдалась активация фибробластических клеток, накопление коллагеновых волокон и формирование грубого рубца.

БМА стимулирует миграцию макрофагов М1 системы активации в соединительной и скелетной мышечной ткани, что способствует эффективному и полноценному очищению раны от раневого дебриса, ингибированию фиброза и приводит к адекватной полноценной регенерации [12, 7, 6]. Известно, что макрофаги являются ключевым звеном, определяющим течение и исход регенерации [13].

Целью данного исследования явилось выявление морфофункциональных характеристик и цитокинового профиля макрофагов миометрия рога матки экспериментальных животных. Т.к. данное исследование связано с использованием ряда моноклональных антител, имеющих видоспецифичный резидуальный аффинитет к антигенам крыс, были проведены аналогичные эксперименты на самках крыс.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 25-ти самках крыс Wistar массой 200-250 г. Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ РФ от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». Животные находились в стационарных клетках индивидуально. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорационный ПЗК-92. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводную очищенную воду всем животным давали без ограничений в поилках.

БМА разработан в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России» (руководитель – проф. Э.Р. Мулдашев). Указанный биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР № 87 901-87 от 22.07.1987 г. Он представляет собой трансплантат с объемно-волокнистой структурой, приготовленный в данном случае из сухожилий крыс и обработанный по технологии Аллоплант®.

Под внутримышечным наркозом с применением раствора кетамина продольный разрез маточного рога производили фокусированным лучом CO₂-лазера в режиме мощности 40-60 Вт «коагуляция» с помощью установки Coherent 3000L (Coherent Inc., США). В первой серии экспериментов у 10-ти животных (контрольная группа) делали разрез лазером, дефект ушивали викрилом. У 15-ти крыс (опытная группа) делали разрез лазером и заполняли дефект стенки маточного рога алло-

генным биоматериалом для замещения объемных дефектов. Переднюю брюшную стенку ушивали непрерывным двуслойным викриловым швом 6/0 (Ethicon, США). Животных выводили из опыта через 7, 14, 30, 60, 120 суток после операции путем инсуффляции летальной дозы паров фторотана. Гистологические срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону. Гистохимические исследования для определения суммарной фракции кислых гликозаминогликанов проводили по методу Хейла [2].

Иммуногистохимические исследования проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 4-5 мкм с минимальной площадью 1 см². Для этого аутопсийный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезжизивали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия). Использовали непрямой стрептавидин-биотин-тиновый метод с применением моноклональных антител к PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) (клон PC 10, 1:300), vimentin (клон C 20, 1:300), CD 68 (клон ED 1, 1:300), TGFβ1 (трансформирующий фактор роста бетта) (клон TB 21, 1:300), FGF 1 (фактор роста фибробластов) (клон C 19, 1: 300) (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотин-тиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Микроскопические исследования проводились с использованием све-

тового микроскопа со специализированным программным обеспечением управления настройками и захватом изображения Leica DMD 108 (Германия).

Результаты исследований

После имплантации БМА в мышечный слой рога матки в начальные сроки (7 суток) наблюдалась умеренная макрофагально-фибробластическая инфильтрация частиц биоматериала клетками, за счет которых происходили изменения тинкториальных свойств. Частицы набухали, проявляли признаки пикринофилии и резорбировались клетками макрофагального ряда. Среди инфильтрирующих клеток выявлялись макрофаги, которые постепенно мигрировали к фрагментам биоматериала. Макрофаги были овальной или вытянутой формы с округлым ядром, располо-

женным центрально. Цитоплазма в виде тонкого ободка располагалась вокруг ядра и образовывала короткие выросты (рис. 1).

Максимальная численность клеток нарастала в период 14-30 суток. В данное время частицы трансплантата практически не определялись. В зоне операции обнаруживалось массивное скопление макрофагальных клеток. Макрофаги были увеличены в размере. В широком ободке цитоплазмы прослеживались разнокалиберные фагоцитарные вакуоли, которые придавали клетке пенистый вид. Тем не менее, признаков гранулематозного воспаления, выражающегося в наличии гигантоклеточных форм макрофагов, не было. Окружающая ткань была представлена тяжами гладкомышечных клеток одновекторного направления. Признаков грубого рубцевания не наблюдалось (рис. 2а).

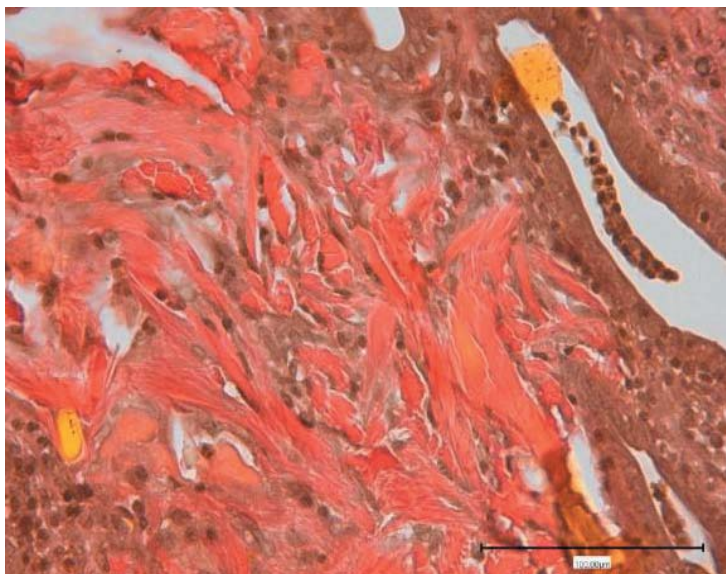


Рис. 1. Умеренная инфильтрация макрофагами, набухание и лизис частиц БМА в миометрии рога матки крысы через 7 суток. Окраска по Ван Гизону.

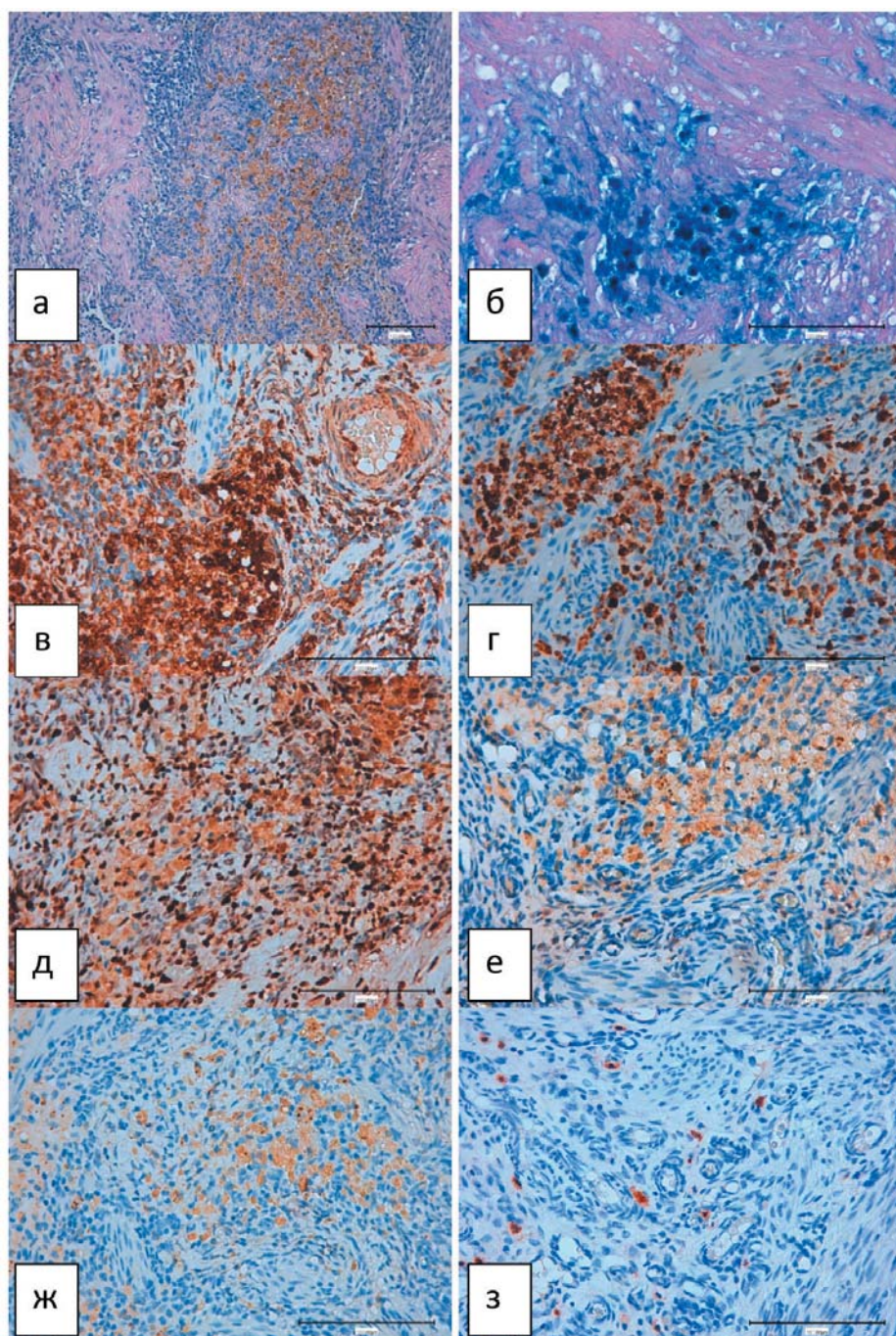


Рис. 2. Серийные срезы ткани рога матки крысы через 30 суток после введения БМА. А – интенсивная макрофагальная реакция, окраска гематоксилином и эозином; Б – гликозаминогликаны в цитоплазме макрофагов, окраска по Хейлу с докраской эозином; В – vimentin⁺; Г – CD 68⁺; Д – PCNA⁺; Е – FGF1⁺; Ж – TGFβ1⁺; З – IL1⁺ непрямым иммунопероксидазный метод выявления антител с докраской гематоксилином.

В начальные сроки эксперимента (7 суток) макрофагальные клетки при выявлении PCNA антигена не окрашивались, спустя 30 суток макрофаги были PCNA⁺ позитивны (рис. 2д). На серийных срезах аутопсийного материала выявлялись следующие фенотипические характеристики: в цитоплазме макрофагов определялись гликозаминогликаны (рис. 2б), определялся белок промежуточных филаментов vimentin (рис. 2в), противовоспалительные цитокины – FGF1, TGFβ1 – отсутствовали, либо реакция была слабо выражена (рис. 2е, ж), провоспалительные цитокины IL1, тем не менее, выявлялись (рис. 2з). Все макрофаги были CD 68-позитивны (рис. 2г).

Спустя 60 суток в миометрии рога матки крыс происходила полноценная

регенерация ткани. Она была представлена разновекторными кластерами лейомиоцитов в окружении тонких соединительнотканых прослоек. Частиц биоматериала и скоплений макрофагов в данный период не обнаруживалось (рис. 3).

В контрольной группе животных без использования биоматериала в процессе заживления дефектов наблюдался дефицит CD 68⁺ клеток и признаки их функциональной незрелости. Количество TGFβ1⁺ макрофагов (M2) значительно превосходило долю макрофагов с провоспалительной направленностью, в результате чего происходило формирование грубого рубца с дальнейшим перерождением в жировую ткань. Vimentin⁺ и Хейл⁺ макрофагов в очаге заживления не зафиксировано.

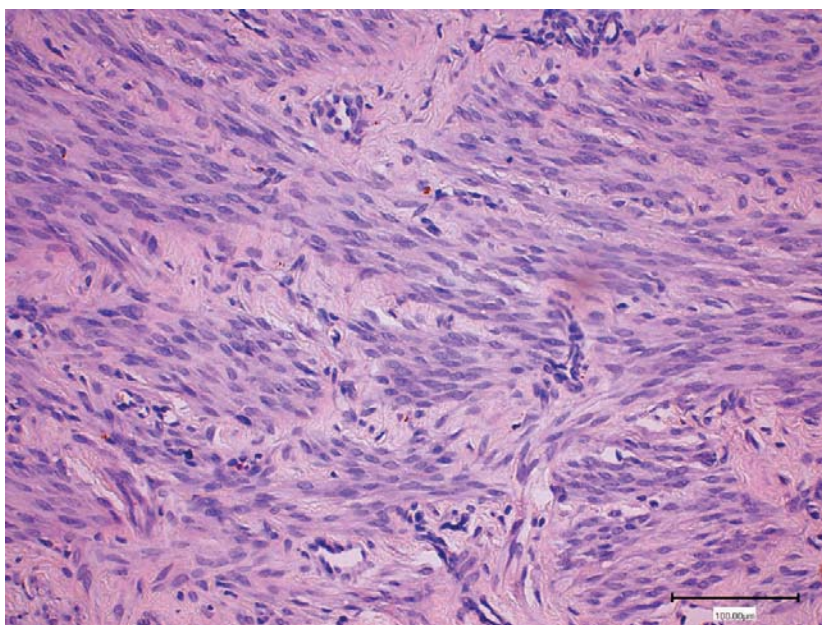


Рис. 3. Миометрий рога матки крысы после имплантации БМА через 60 суток. Окраска гематоксилином и эозином.

Обсуждение результатов

Известно, что макрофаги являются гетероморфной клеточной популяцией. Они могут проявлять как секреторную активность, так и фагоцитарную, выраженную в той или иной степени. В зависимости от условий микроокружения макрофаги проявляют цитокиновую антагонистическую полярность M1 и M2. Взаимодействие и выраженность цитокиновых фаз определяет течение и исход патологического процесса [19].

При регенерации миометрия рога матки крыс с использованием БМА происходила усиленная миграция макрофагов CD68⁺, которые становились доминирующими клетками гистиона в пролиферативной стадии воспаления. Макрофаги CD68⁺ проявляют яркое интенсивное окрашивание, что свидетельствует о наличии большого количества микросиалина. Микросиалин – высокогликозилированный трансмембранный гликопротеин члена семейства LAMP (лизосом-ассоциированных мембранных протеинов). Он локализован преимущественно в мембране поздних эндосом [18]. Кроме того, показано, что данная молекула процессирует антиген путем постепенного ферментного расщепления фагоцитируемых клеткой объектов [17]. Это свидетельствует об активной фагоцитарной деятельности клеток и полноценном очищении раны от раневого детрита и самого биоматериала, который к 30-ти суткам полностью резорбируется.

Классическое представление о происхождении макрофагов – это происхождение из костномозговых предшественников [13]. Однако в опытной группе нами были зафиксированы

vimentin⁺ позитивные макрофаги, содержащие цитоплазматические белки промежуточных филаментов, характерные для клеток мезенхимального происхождения. Данные макрофаги имели Хейл-положительную окраску, т.е. секретировали гликозаминогликаны, которые являются компонентом межклеточного матрикса. Признано, что за их выработку ответственны, как правило, клетки фибробластического ряда [13].

Макрофаги мезенхимного происхождения широко распространены в тканях различных органов. Так, наряду с костномозговыми макрофагами, в головном мозге млекопитающих определяются микроглиальные клетки, являющиеся производными желточного мешка [16]. В стекловидном теле гиациты, помимо фагоцитарной функции в патологических условиях, также способны к секреции компонентов межклеточного матрикса [1, 20]. Известно, что плацентарные макрофаги (клетки Кашенко-Гофбауэра) происходят из мезенхимальных стволовых клеток внезародышевой мезенхимы до начала циркуляции моноцитов [8]. Локализуются они в ворсинках хориона. Стромальные плацентарные макрофаги возникают из мезенхимы одновременно с местным ангиогенезом и являются самовозобновляющейся митотически активной популяцией клеток, независимой от эмбриональных моноцитов. Характерной чертой данных клеток является наличие многочисленных крупных вакуолей, содержащих гликозаминогликаны [9, 15]. Клетки Кашенко-Гофбауэра, обладая фагоцитарной деятельностью, участвуют во многих процессах ре-

моделяции ворсинок хориона – ткани, представленной рыхлой соединительной тканью с большим содержанием гликозаминогликанов, заполняющих интерцеллюлярное пространство [8].

Ранее в наших работах отмечались «матриксформирующие» макрофаги, обнаруженные при имплантации БМА в соединительной ткани и имеющие морфологические характеристики подобные таковым плацентарных макрофагов [11]. Предположение о причислении vimentin⁺ макрофагов к категории клеток Кащенко-Гоффбауэра закрепляется фактом выявления в их цитоплазме большого количества гликозаминогликанов, интенсивно окрашивающихся в синий цвет при проведении гистохимической реакции по методу Хейла. Полное раскрытие механизмов действия Vimentin⁺/Хейл⁺/CD68⁺ макрофагов после применения аллогенных биоматериалов требует дополнительных исследований. Можно предположить, что их наличие в зоне регенерации связано с синтезом углеводного компонента внеклеточного матрикса, определяющего зрелость коллагеновых волокон соединительнотканых прослоек, создание гомеостаза в очаге замещения реактивной зоны при адекватной полноценной регенерации мышечных тканей, и играть структурно-информативную роль для клеточных коопераций.

Т.к. в начальные сроки эксперимента PCNA⁺ макрофаги не выявлялись, следовательно, на этой стадии эксперимента в зоне имплантации БМА накопление макрофагов происходило за счет миграции резидентов и костномозговых предшественников, а в более отдаленные сроки популяция кле-

ток поддерживалась за счет деления vimentin⁺ макрофагов. Известно, что протеогликаны, высвобождающиеся при деградации и лизисе БМА, являются хемоаттрактантами макрофагальных клеток [10]. В случае, когда резервные клеточные возможности истощаются, или их недостаточно для полноценной утилизации биоматериала, в зону поражения рекрутируются дополнительные источники.

Наши исследования показали, что окончательный итог регенерации гладкой мышечной ткани зависит от фенотипа макрофагов и их секреторной активности, которая носит дуалистический характер. Заживление дефекта рога матки с использованием аллогенного биоматериала может быть обусловлено низкой степенью коллагеногенеза, регуляция которого осуществляется в т.ч. макрофагами [3]. Так, антигены FGF1 и TGFβ1 в макрофагах миометрия практически не определялись или их количество было минимальным. Классически активированные макрофаги, содержащие провоспалительные монокины (IL1), подавляли экспрессию противовоспалительных, т.к. они являются антагонистами по отношению друг к другу [14]. Это обуславливало полноценный фагоцитоз самого биоматериала и раневого детрита, обладающего антигенностью, и снижение скорости коллагеногенеза.

Заключение

В процессе регенерации мышечного слоя рога матки, индуцированного аллогенным биоматериалом, наряду с костномозговыми макрофагами участвуют мезенхимные аналоги с активной фагоцитарной функцией и с провоспалительным цитокиновым спектром M1.

Список литературы

1. Вит В.В. Строение зрительной системы человека: уч. пособ. - Одесса: Астропринт. 2010. 220 с.
2. Кононский А.И. Гистохимия. - Киев: «Вища школа». 1976. С. 146-147.
3. Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал – ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани // Российский биотерапевтический журнал. 2014. № 4. Т. 13. С. 37-44.
4. Лебедева А.И. Посттравматический гистогенез миометрия рога матки кролика, индуцированный аллогенным биоматериалом // Технологии живых систем. 2015. № 1. С. 34-40.
5. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Регенерация гладкой мышечной ткани рога матки кролика после разреза лучом лазера и применения аллогенного биоматериала // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2013. № 4. Т. 28. С. 41-45.
6. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Гареев Е.М. Роль резидентных макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной биоматериалом Аллоплант // Биомедицина. 2014. № 2. С. 43-50.
7. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Щербаков Д.А. Изучение активности макрофагов и их цитокинового спектра при регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной аллогенным биоматериалом // Российский иммунологический журнал. 2013. № 2-3. Т. 7(16). С. 305.
8. Милованов А.П. Патология системы мать-плацента-плод: рук-во для врачей. – М.: Медицина. 1999. 448 с.
9. Милованов А.П., Шатилова И.Г., Кадыров М. Гистофизиология плацентарноматочной области // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. 1997. № 2. С. 38-44.
10. Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии - Уфа: Башкортостан -.168 с., 2000.
11. Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Волгарева Е.А. Ультраструктура макрофагов, выявляемых при имплантации аллогенного биоматериала Аллоплант // Морфология. 2006. № 1. С. 53-56.
12. Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Зыков О.В. Роль макрофагов в регенерации соединительной ткани при имплантации биоматериалов // Здравоохранение Башкортостана. Актуальные вопросы патологии. 2004. № 4. С. 146-149.
13. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. - М.: Медицина. 1981. 312 с.
14. Abraham D.J., Xu S., Black C.M., et al. Tumor necrosis factor α -suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor- β in normal and scleroderma fibroblasts // J. Biol. chem. 2000. Vol. 275. Is. 20. P. 15220-15225.
15. Castelluci M., Celona A., Bartels H., et al. Mitosis of the Hofbauer cells: possible implications for a fetal macrophage // Placenta. 1987. Vol. 8. No. 1. P. 65-76.
16. Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M.F., Conway S.J., Ng L.G., Stanley E.R., Samokhvalov I.M., Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages // Science. 2010. No. 5. Vol. 330(6005). P. 841-845. doi: 10.1126/science.1194637.
17. Holness C.L., da Silva R.P., Fawcett J., Gordon S., Simmons D.L. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/Igp family // J. Biol. chem. 1993. Vol. 268. P. 9661-9666.
18. Linehan S.A. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs // BMC Immunol. 2005. Vol. 6. P. 1471-1477.
19. Mantovani A., Sica A., Locati M. Macrophage polarization comes of age // OJRM. 2005. Vol. 23. Is. 4. P. 344-346. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.001.
20. Yamada H., Obata H., Kaji Y., Yamashita H. Expression of transforming growth factor superfamily receptors in developing rat eyes // Jpn. J. Ophthalmol. 1999. No. 43. P. 290-294.

Alloplant biomaterial when used in myometrium regeneration of the experimental animal uterine horn is a macrophage stimulator of the mesenchymal origin

A.I. Lebedeva

Alloplant biomaterial (ABM) was implanted into the myometrium defect of the rat's uterine horn. As a result of that procedure full-blown structural regenerate consisting of leiomyocyte clusters and interlayers of the fibrous connective tissue was being formed. Regeneration invoking M 1 macrophages of the mesenchymal origin containing glycosaminoglycanes was taking place. In the control group there was revealed a deficit of macrophages with the formation of the rough scar in the defect zone when ABM hadn't been used. The morphological investigation was carried out with the use of histological (hematoxylin and eosin stain as per van Gieson), histochemical (Hale's stain) and immunohistochemical (vimentin, CD68, IL1, FGF1, TGFβ1) methods.

Key words: Alloplant biomaterial, macrophages, myometrium uterine horn, regeneration.