

УДК 616-003.935

РЕГЕНЕРАЦИЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ИНДУЦИРОВАННАЯ БИОМАТЕРИАЛОМ АЛЛОПЛАНТ

Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Щербakov Д.А.

ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, Уфа,
e-mail: jeol02@mail.ru

Применение аллогенного губчатого биоматериала при глубоком повреждении мышцы голени крысы способствовало полному восстановлению дефекта. В группе животных без использования биоматериала в результате заживления дефекта происходило образование рубца с дальнейшим перерождением в жировую ткань. Использовались гистологические и электронномикроскопические методы исследования.

Ключевые слова: аллогенный губчатый биоматериал, скелетная мышечная ткань, регенерация

REGENERATION OF SKELETAL MUSCLE TISSUE ON EXPERIMENTAL ANIMAL, INDUCED BY ALLOPLANT BIOMATERIAL

Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Musina L.A., Scherbakov D.A.

FSBI «Russian Eye and Plastic Surgery Center of the Health Ministry of the Russian Federation», Ufa,
e-mail: jeol02@mail.ru

The use of the allogeneic spongy biomaterial for deep injury of rat tibia has resulted in complete restoration of the defect. In the group of animals not using the biomaterial, during healing process there was observed scar formation with further transformation into adipose tissue. Histological and electron and microscopic research methods were used.

Keywords: allogenic biomaterial sponge, skeletal muscle tissue, regeneration

Посттравматическое восстановление скелетных мышц является актуальной медико-биологической проблемой. Как правило, после глубоких мышечных повреждений полноценного восстановления ткани не происходит. На его месте формируется грубоволокнистый рубец, что приводит к нарушению функционирования органа. Существующие технологии коррекции данных дефектов – мышечная аутопластика, аллопластика, ксенопластика, клеточные технологии, генная терапия являются трудоемкими, травматичными и сопряжены с осложнениями [1]. Одним из перспективных направлений в регенеративной медицине являются тканевая инженерия с использованием биодеградируемых трансплантатов [3]. Биоматериалы Аллоплант в различной модификации зарекомендовали себя как эффективные стимуляторы регенерации соединительной ткани [6]. Целью исследования явилось определение морфологических аспектов регенерации скелетной мышечной ткани после механического повреждения с использованием одного из его видов – аллогенного губчатого биоматериала (АГБ).

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали половозрелых крыс породы Вистар. 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 наносили 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. После чего на кожу в обоих случаях накладывали швы Vicryl 6–0. Малоберцовый нерв не повреждали. 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 [7]. Нитевидный сухожильный трансплантат, также был аллогенного происхождения, изготовлен из сухожилия крысы и представлял собой нить, которая применялась для фиксации трансплантируемого АГБ к культям мышцы. Из опыта животные выводились путем инсуффляции летальной дозы паров раствора фторотана. Забор биопсийного материала проводили через 3, 7, 14, 30, 60 и 90 суток после эксперимента. Все трансплантаты были обработаны по оригинальной запатентованной технологии АллоплантО, разработанной в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии МЗ РФ» (Патент РФ на изобретение № 2189257, ТУ 9398-001-04537642-2011). Гистологические срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону и по Маллори. Микроскопические исследования проводились с использованием светового микроскопа AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и программой анализа изображений Axiovision (C. Zeiss, Германия). Для электронномикроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 2,5%-м р-ре глутараль-

дегида, приготовленного на какодилатном буфере (рН 7,2–7,4) с дофиксацией в 1%-ном р-ре OsO₄ на том же буфере. Материал обезжизнявали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия) и окрашивали их раствором толуидинового синего на 2,5%-ном р-ре безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронномикроскопического исследования. Ультратонкие срезы контрастировали 2%-ным водным р-ром уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кв.

Результаты исследования и их обсуждение

В контрольной группе в начальные сроки в ране обнаруживались очаги острого воспаления и кровоизлияния. В период 7-14 суток отмечалось развитие пролиферативной стадии воспаления. Дефект замещался грануляционной тканью, представленной толстыми фуксинофильными пучками коллагеновых волокон, инфильтрированных

соединительнотканнми и иммуногенными клетками. Среди клеток соединительной ткани преобладали клетки фибробластического ряда: мезенхимные клетки, фибробласты с активной коллагенсинтетической деятельностью (коллагенобласты II типа). В меньшей степени выявлялись лимфоциты, макрофаги, преимущественно секреторного типа, и их производные – эпителиоидные клетки и гигантские клетки инородных тел. Отмечался скудный васкулярный рисунок. Резецированные мышечные волокна запечатывались коллагеновыми волокнами за счет наплыва сарколеммы. Через 21 сутки в месте дефекта выявлялись признаки трансформации грануляционной ткани в жировую за счет терминальной дифференцировки фибробластов в адипоциты. В цитоплазме фибробластов помимо характерных резко расширенных каналов гранулярного эндоплазматического ретикулома выявлялись многочисленные разнокалиберные липидные капли (рис. 1).

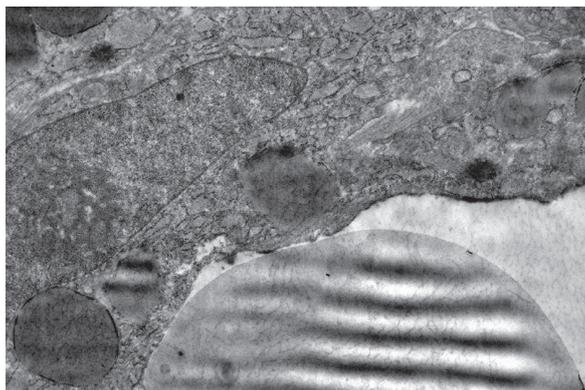


Рис. 1. Фибробластическая клетка адипоцитарного направления с хорошо развитой сетью ГЭР. Через 21 сутки после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Электронограмма. Увеличение x6000

Спустя 30 суток в области дефекта обнаруживался регенерат, состоящий из мы-

шечной, жировой и плотной волокнистой соединительной тканей (рис. 2).

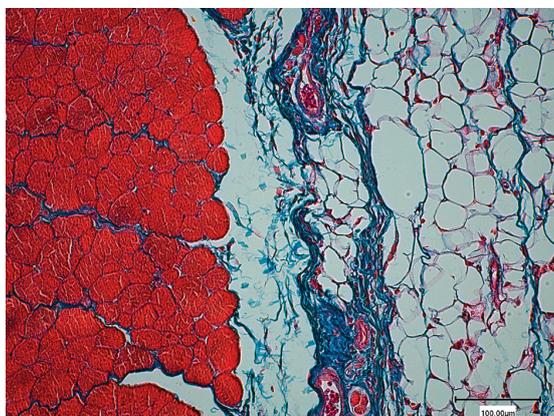


Рис. 2. Жировое перерождение соединительной ткани через 30 суток после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Окраска по Маллори

В контрольной группе стадия острого воспаления переходила в фазу пролиферации с образованием гранулематозной ткани, где была наиболее усилена фибробластическая деятельность. Выраженная мезенхимная реакция и дифференциация в collagenобласты II типа способствовала интенсификации синтеза collagenовых волокон. Выявлялся их дефицит и дифференциация в неактивные гигантские формы с низкой секреторной активностью. Известно, что фенотипическая незрелость и фагоцитарная инертность макрофагов могла способствовать незавершенному фагоцитозу и привлечению лимфоидных клеток, что обуславливало фиброзирование дефекта в мышечной ткани [2]. Происходила редукция гемокapилляров. Ишемия тканей могла способствовать распаду мышечных волокон и массовой гибели клеток, что также провоцировало развитие фиброза [2]. Результатом заживления мышечного дефекта явилось образование рубца с последующим перерождением в жировую ткань.

В опытной группе через 3 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. Признаки острого воспаления были обусловлены механическими воздействиями, возникши-

ми вследствие оперативного вмешательства. Проницаемость кровеносных сосудов способствовала клеточной элиминации, набуханию и ферментативному воздействию на трансплантат. Через 7 суток воспалительная инфильтрация в реактивной зоне и в самом трансплантате менялась на макрофагально-фибробластическую. Выявлялись макрофаги фагоцитарного типа, а фибробласты с умеренно расширенными каналами гранулярного эндоплазматического ретикулума классифицировались как collagenобласты I типа – клетки с умеренным синтезом collagenа. Наряду с соединительнотканскими 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 происходило замещение АГБ от периферии до центра по всей площади. Наблюдались признаки формирования мышечно-соединительнотканного регенерата с преобладанием рыхлой соединительной ткани. Регенерат был представлен тонкими пучками collagenовых волокон инфильтрированных макрофагами и фибробластами. Причем, макрофаги присутствовали в наибольшем количестве. Строму сопровождали гемокapилляры, свободные миоциты, образующие почки роста и тяжи новообразованных тонких мышечных волокон (рис. 3).

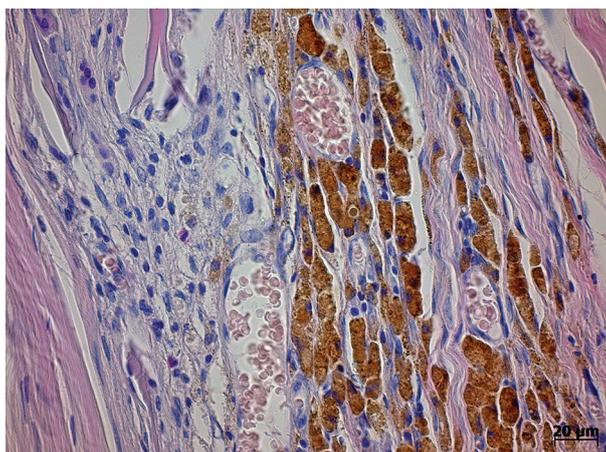


Рис. 3. Массивная инвазия макрофагов в центральной зоне через 14 суток после имплантации в скелетную мышцу крысы губчатого аллотрансплантата. Окраска гематоксилином и эозином

Через 30 суток в очаге трансплантации обнаруживался мышечно-соединительнотканый регенерат с преобладанием мышечной ткани. Пространственная ориентация растущих миосимпласов была

параллельна балкам предсуществующего биоматериала. Через 60 – 90 суток регенерат был представлен пучками мышечных волокон окутанных эндо- и перимизием (рис. 4).



Рис. 4. Новообразованная мышечная ткань в зоне трансплантации зубчатого аллотрансплантата спустя 90 суток. Параллельно ориентированные пучки мышечных волокон окутаны эндо- и перимизием. Окраска по Маллори

Биоматериалы Аллоплант изготавливаются из волокнистых соединительнотканых кадаверных тканей. После их имплантации при замещении у реципиента формируется собственная органотипическая рыхлая волокнистая соединительная ткань [5, 6], что подтверждает данное исследование. Между расширенными стромальными элементами свободно мигрировали эндотелиальные клетки гемокapилляров и малодифференцированные миогенные клетки. Продукты резорбции АГБ являются хемоаттрактантами макрофагов и способствуют их фенотипическому созреванию в клетки фагоцитарного типа [5], что наблюдалось в опытной группе. Активированные макрофаги, в свою очередь, влияют на фенотипизм фибробластов, которые ингибируют избыточный синтез коллагена. По данным исследователей, макрофаги также способствуют успешному приживлению миогенных клеток предшественников в раннем периоде заживления скелетной мускулатуры [8, 9, 10]. Происходила ранняя активация миосателлитов и их дифференциация в зрелые миоциты. Новообразованные миосимплеты сопровождали коллагеновые волокна и свободно проникали между ними. За счет удлинения и гипертрофии мышечных волокон, они постепенно вытесняли новообразованную рыхлую соединительную ткань на периферию мышечного пучка. Так формировался эндомизий и перимизий. В данном случае, соединительная ткань выступает «в качестве источника индукционно-формативной тканевой регуляции», а мышечная ткань является регулируемой системой [4].

Таким образом, при использовании АГБ наблюдалось восстановление скелетной

мышечной ткани на месте утраченной, в то время как в контрольной группе без применения биоматериала происходило формирование неполноценного соединительно-жировотканного регенерата.

Список литературы

1. Булякова Н.В. Морфофункциональные особенности тимуса и мышечных регенератов при воздействии лазерного излучения и аллопластики мышечной ткани взрослого животного в область мышечной травмы / Н.В. Булякова, В.С. Азарова // Известия РАН. Серия биологическая. – 2009. – № 1. – С. 18-26.
2. Данилов Р.К. Раневой процесс: гистогенетические основы – СПб: ВМедА им С.М. Киров, 2008.- 308 с.
3. Зорин В.Л. Характеристика мирового рынка клеточных технологий / В.Л. Зорин, В.Р. Черкасов, А.И. Зорина, Р.В. Деев // КТТИ – 2010, V 3. – С. 96-115.
4. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей. – Л.: Медицина, 1984. – 232 с.
5. Лебедева, А.И. Структурно-функциональная характеристика макрофагов, выявленных при имплантации биоматериалов (экспериментально-морфологическое исследование): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа. – 2004. – 23 с.
6. Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. Уфа: Башкортостан, 2000. – 168 с.
7. Хасанова Ю. С. Структурная модификация аллогенного сухожильного биоматериала и морфологические особенности его замещения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 2008. – 26 с.
8. Lesault P.F. Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cell into MDX skeletal muscle / P.F. Lesault, M. Theret, M. Magnan et al. // PLoS One. – 2012. – V.7, № 10. – P. 46698.
9. Segawa M. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis / M. Segawa, S. Fucada, Y. Yomamoto, H. Yahagi, M. Kanematsu, M. Sato, T. Ito, A. Uezumi, S. Hayashi, Y. Miyagoe-Suzuki, Sh. Takeda, K. Tsujikawa, H. Yamamoto // Experimental cell research. – 2008. – V. 314. – P. 3232-3244.
10. Stefater J.A. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration / J.A. Stefater, S. Ren, R.A. Lang, J.S. Duffield // Trends Mol Med / 2011. – V. 17, № 12. – P. 743-752.