

Эпителиально-соединительнотканые взаимоотношения в условиях репаративной регенерации

УДК 617.713

Л.А. МУСИНА, Р.Ф. ШАКИРОВ, В.У. ГАЛИМОВА, О.Р. ШАНГИНА, А.И. ЛЕБЕДЕВА, Р.З. КАДЫРОВ
Всероссийский центр глазной и пластической хирургии МЗ РФ, г. Уфа

Биоматериал «Аллоплант» как ингибитор рубцевания поврежденной роговицы (иммуногистохимическое исследование)

Контактная информация:

Мусина Ляля Ахияровна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела морфологии

Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, д. 67/1, тел.: +7 (347) 293–42–35, e-mail: morphoplant@mail.ru

Гистологическими, иммуногистохимическими, морфометрическими и статистическими методами были исследованы энуклеированные глазные яблоки экспериментальных кроликов после химического ожога щелочью (2,5% р-р гидроксида натрия) и перилимбального введения биоматериала «Аллоплант» (диспергированная форма аллогенного биоматериала «Стимулятор регенерации»).

Цель исследования – определение цитокинового профиля в процессе регенерации поврежденной роговицы после перилимбального введения аллогенного биоматериала. Исследования роговицы и лимбальной зоны глаза экспериментальных животных проводили на 7, 14, 30, 90 и 180 сутки после операции.

Результаты. Установлено, что после перилимбального введения биоматериала «Аллоплант» в поврежденной роговице экспериментальных кроликов в сравнении с контрольной группой (без лечения) отмечается усиление пролиферативной активности эпителиальных клеток роговицы, привлечение большого количества фагоцитарных макрофагов (CD68+ клетки) и низкий уровень экспрессии цитокина трансформирующий фактор роста TGF- β 1 (фактор фиброза). Совокупность указанных факторов приводит к быстрой эпителизации, ускоренной утилизации клеточного и тканевого детрита и ингибированию процесса грубого рубцевания восстанавливаемых тканей роговицы глаза.

Ключевые слова: биоматериал «Аллоплант», перилимбальное введение, регенерация роговицы, трансформирующий фактор роста TGF- β 1, ингибитор рубца.

DOI: 10.32000/2072-1757-2019-1-112-116

(Для цитирования: Мусина Л.А., Шакиров Р.Ф., Галимова В.У., Шангина О.Р., Лебедева А.И., Кадыров Р.З. Биоматериал «Аллоплант» как ингибитор рубцевания поврежденной роговицы (иммуногистохимическое исследование). Практическая медицина. 2019. Том 17, № 1, С. 112–116)

L.A. MUSINA, R.F. SHAKIROV, V.U. GALIMOVA, O.R. SHANGINA, A.I. LEBEDEVA, R.Z. KADIROV

Russian Eye and Plastic Surgery Center of the Russian Federation Health Ministry, Ufa,
the Republic of Bashkortostan, Russian Federation

«Alloplant» biomaterial as the inhibitor of scarring the damaged cornea (immunohistochemical study)

Contact details:

Musina L.A. – D.Sc. (biology), Leading Researcher at the Morphology Department

Address: 67/1 R. Sorge St., Ufa, the Republic of Bashkortostan, Russian Federation, 450075, tel.: +7 (347) 293–42–35, e-mail: morphoplant@mail.ru

The relevance of the research is stipulated by the dominant role of cytokines in the regulation of tissue regeneration processes in damages. Cytokines trigger the processes of tissue epithelization and granulation having a significant impact on scar formation.



Purpose. To determine the cytokine profile during the regeneration process in the damaged cornea after circumlimbal insertion of the allogenic biomaterial.

Material and methods. Histological, immunohistochemical, morphometric and statistic methods were used to study the enucleated eyeballs of experimental rabbits after chemical burn by alkali (2.5% solution of sodium hydroxide) followed by a circumlimbal insertion of «Alloplant» biomaterial (dispersed form of allogenic biomaterial «Stimulator of regeneration»). The studies of the cornea and the eye limbal zone of the experimental animals were carried out on the 7th, 14th, 30th, 90th and 180th days after the operation.

Results. It was established that after the perilimbal insertion of the Alloplant biomaterial into the damaged cornea of the experimental rabbits compared with the control group (with no treatment) the proliferative activity of the corneal epithelial cells increased, large amounts of phagocytic macrophages (CD68+cells) were involved, and the low level of cytokine expression was detected that transforms the growth factor TGF- β 1 (fibrosis factor). These factors leads to the fast epithelization, accelerated utilization of the cell and tissue detritus, and inhibition of the gross scarring process of the restoring corneal tissues.

Conclusion. Circumlimbal insertion of «Alloplant» biomaterial into the damaged cornea serves as a regeneration stimulator and an inhibitor of tissue scarring.

Key words: «Alloplant» biomaterial, circumlimbal insertion, corneal regeneration, TGF- β 1 transforming growth factor, scarring inhibitor.

(For citation: Musina L.A., Shakirov R.F., Galimova V.U., Shangina O.R., Lebedeva A.I., Kadirov R.Z. «Alloplant» biomaterial as the inhibitor of scarring the damaged cornea (immunohistochemical study). Practicalmedicine. 2019. Vol. 17, no. 1, P. 112–116)

В практике ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России» довольно широко применяется трансплантационная технология в виде перилимбального введения диспергированного аллогенного биоматериала «Стимулятор регенерации» (производится в ФГБУ ВЦГПХ МЗ России под маркой «Аллоплант»). Предложенный безопасный малоинвазивный метод лечения при различных стадиях кератоконуса, ожогах и дистрофических заболеваниях роговицы благотворно влияет на процесс регенерации роговицы, предотвращая ее грубое рубцевание [1, 2, 3]. В многочисленных исследованиях установлено, что в процессах регенерации поврежденных тканей основную роль играют цитокины. Они выделяются клетками и являются гормоноподобными белками и пептидами. Цитокины запускают процессы эпителизации и грануляции тканей, оказывая большое влияние на формирование рубца [4].

Цель исследования – определение цитокинового профиля в процессе регенерации поврежденной роговицы после перилимбального введения аллогенного биоматериала.

Материал и методы

В качестве одного из вариантов поражения роговицы применяли экспериментальную модель щелочного ожога роговицы у кроликов – метод [Obenberger]. [5]. На роговицу животных накладывали диск фильтровальной бумаги, смоченной 2,5% раствором гидроксида натрия (экспозиция 5 с) под местной анестезией (0,4% инокаином). В опытной группе животных (15 кроликов) через 24 ч после ожога делали перилимбальное обкалывание мелко диспергированным биоматериалом «Аллоплант» «Стимулятор регенерации» (в разведении 50 мг биоматериала на 5 мл физиологического р-ра). Контрольную группу составили 6 кроликов с ожогами роговицы, но без введения аллогенного биоматериала. Глазные яблоки кроликов энуклеировали на 4, 7, 14, 30, 90 и 180 сутки

после проведенной операции и фиксировали в 10% забуференном формалине по Лилли. Вырезали роговицу вместе с прилегающей склерой, заливали в парафин. Эксперименты проводили в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г., приказ Минвуза от 13.11.1984 г. № 724), «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986 г. и Федерального закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 1.01.1997 г. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по методам Ван-Гизона и Маллори. Иммуногистохимические исследования проводили с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия) с использованием поликлональных антител к TGF- β 1 – трансформирующему фактору роста (фактор фиброза), к PCNA – ядерному белку пролиферирующих клеток, к CD68 (маркер фагоцитарных макрофагов), к Thy-1 – маркеру стволовых мезенхимальных клеток костномозгового происхождения (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первичных антител. Для подсчета меченых клеток и фотографирования использовали микроскоп Leica 108MD со встроенной камерой (Leica, Германия). Клетки, экспрессирующие TGF- β 1, считали в поле зрения микроскопа (n=20 на каждый срок) при увеличении X400. Оценку достоверности и характера их изменений проводили методами непараметрической статистики. Общую оценку динамики изменения количества клеток, экспрессирующих TGF- β 1, осуществляли методом рангового дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллесу, а внутри- и межгрупповые сравнения по срокам наблюдений ранговым критерием Манна-Уитни [6, 7].

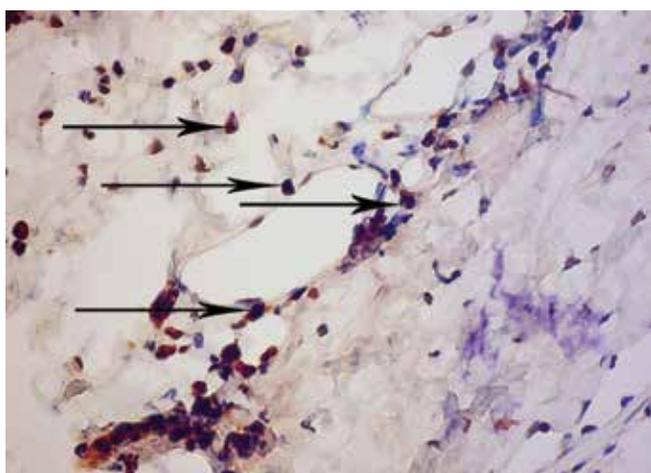
Результаты

В опытной группе экспериментальных животных перилимбальное введение диспергированного аллогенного биоматериала уже на 4 сутки вызывало приток к частицам биоматериала и в ткани из лимбальных сосудов большого количества крупных макрофагов, которые иммуногистохимически метились как фагоцитарные CD68+ клетки (окрашивание цитоплазмы в желто-коричневый цвет) (рис. 1). Интенсивность проявления воспалительных процессов в зоне ожога у кроликов опытной группы была гораздо слабее, чем в контрольной группе. Соответственно темпы эпителизации раны и восстановления стромальной пластинки роговицы под эпителием в сравнении с контрольной группой ускорялись. Исследования показали, что на 4–7 сутки эксперимента ядерный белок пролиферирующих клеток PCNA в виде интенсивного коричневого окрашивания ядер определяется в базальных клетках эпителия, покрывающего область лимба, а также в клетках растущего на рану эпителиального слоя (рис. 2). При одновременном использовании поликлональных антител на выявление в клетках белка Thy-1 (маркера стволовых мезенхимальных клеток костномозгового происхождения, являющихся предшественниками фибробластов) белок экспрессировался в виде розового окрашивания в цитоплазме и клеточной мембране крупных фибробластоподобных клеток, которые в умеренном количестве выявлялись вокруг лимбальных сосудов.

Через 7 суток по периферии поврежденной зоны роговицы определялся наплывающий на рану однорядный или двурядный уплощенный эпителий,

Рисунок 1
Выход CD68+ фагоцитарных макрофагов (↑) из сосудов лимба (СЛ) на 7 сутки после перилимбального введения биоматериала «Аллоплант» у кролика опытной группы со щелочным ожогом роговицы. Иммуногистохимическая реакция. Докраска гематоксилином. Увел. 400

Fig. 1
Coming of CD68+ phagocytal macrophages (↑) out of the limbic vessels (LV) on the 7th day after circumlimbal injection of the Alloplant biomaterial in a rabbit of experimental group with alkaline burn of cornea. immunohistochemical reaction. Counterstaining with hematoxylin. Magnified 400.

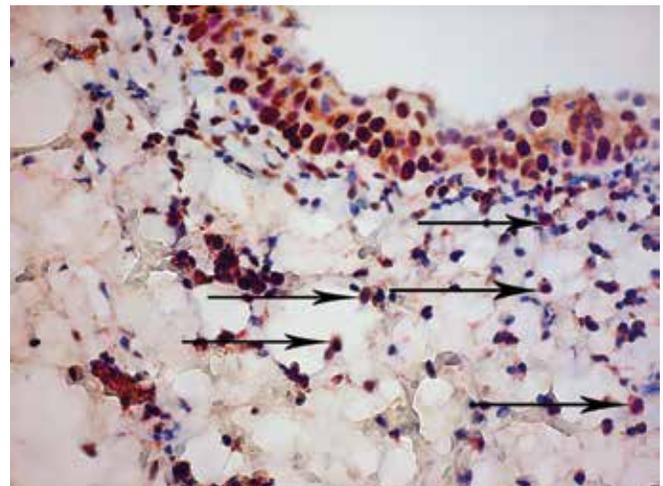


PCNA+ клетки которого активно пролиферировали со стороны лимба. В поверхностных слоях стромы роговицы под регенерирующим эпителиальным слоем в центр раневой зоны мигрировали крупные макрофаги, крупные юные и более мелкие зрелые фибробластические клетки с округлыми ядрами и светлой цитоплазмой веретеновидной формы. Описанные процессы к 30 суткам эксперимента приводили почти к полному восстановлению роговицы в пораженной зоне. Через 3 месяца определялся ровный по толщине многослойный неороговевающий эпителий, состоящий из 5–6 слоев клеток. Многочисленные пучки коллагеновых волокон, образующих роговичные пластины, составляли строму роговицы. На 180 сутки роговица глаза опытных кроликов имела нормальную структуру.

У кроликов контрольной группы вследствие ослабления пролиферативной активности эпителиальных клеток со стороны уцелевших тканей (белок PCNA экспрессировали единичные клетки) процесс эпителизации роговицы по срокам затягивался. Сохраняющаяся в зоне лимба выраженная воспалительная реакция в виде обширных периваскулярных клеточных инфильтратов и низкая пролиферативная активность эпителиальных клеток роговицы со стороны здоровых тканей к 90 суткам приводила к формированию неравномерного слоя переднего эпителия и к грубому руб-

Рисунок 2
Пролиферирующие клетки эпителия с коричневыми ядрами, экспрессирующими белок PCNA, и стволовые мезенхимальные клетки, экспрессирующие белок Thy-1(↑), в зоне лимба на 7 сутки после перилимбального введения биоматериала «Аллоплант» у кролика опытной группы со щелочным ожогом роговицы. Двойная иммуногистохимическая реакция. Докраска гематоксилином. Увел. 400

Fig. 2
Proliferating epithelium cells with brown nuclei expressing protein PCNA and stem mesenchymal cells expressing protein Thy-1(↑), in the limbic zone on the 7th day after circumlimbal injection of the Alloplant biomaterial in a rabbit of experimental group with alkaline burn of cornea. Double immunohistochemical reaction. Counterstaining with hematoxylin. Magnified 400



цеванию стромы роговицы в пораженном очаге. Известно, что бурная воспалительная реакция при тяжелых повреждениях роговицы приводит к миграции в эту зону многочисленных «зрелых» соединительнотканых клеток из склеры, эписклеры, других источников и к формированию плотного, грубого рубца [8]. Причем фибропластическая трансформация в строме роговицы не может достигнуть максимума до тех пор, пока эпителий не покрывает рану [9].

Иммуногистохимические исследования по выявлению в тканях трансформирующего фактора роста TGF- β 1 выявили, что интенсивная экспрессия цитокина клетками почти во все сроки эксперимента определяется в контрольной группе. После перилимбального введения биоматериала у кроликов опытной группы TGF- β 1 экспрессировался значительно меньшим количеством клеток. Так как цитокин TGF- β 1 считается основным фактором фиброза, при регенерации тканей мы провели подробный дисперсионный анализ количественных показателей экспрессии данного белка. Анализ показал, что последовательные изменения количества клеток, экспрессирующих TGF- β 1, статистически значимо зависели от времени, прошедшего после ожога роговицы ($\chi^2=114$, $p<<0,0001$ и $\chi^2=100$, $p<<0,0001$ в контрольной и экспериментальной группе соответственно). Интенсивность этих изменений в обеих группах существенно различается лишь в течение первого месяца после осуществления ожога (рис. 3). Как хорошо видно на диаграмме, на четвертый день после ожога ро-

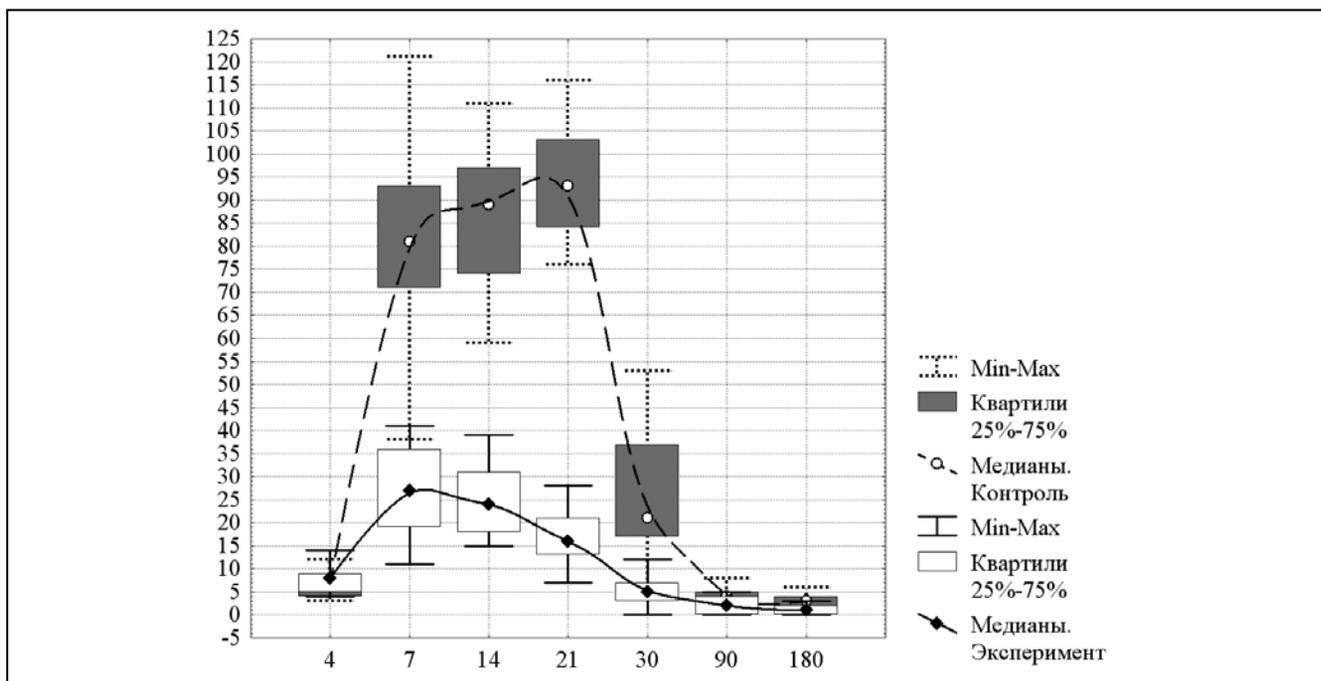
говицы количество клеток, экспрессирующих TGF- β 1, в контрольной и экспериментальной группе варьирует в пределах от 3 до 12 (медиана 7) и от 4 до 14 (медиана 8) соответственно и значимо не различается ($p>0,31$). На 7 день количество таких клеток в обеих группах значимо возрастает, но в контрольной группе этот рост многократно интенсивнее. В контрольной группе к этому сроку медиана распределения числа клеток, экспрессирующих TGF- β 1, возрастает почти на порядок (с 7 до 81), а границы их вариации составляют уже от 38 до 111. В опытной группе медиана распределения таких клеток лишь примерно утраивается (с 8 до 27), причем максимальное их число не превышает 41. В последующие сроки в контрольной группе число клеток, экспрессирующих TGF- β 1, медленно, но последовательно возрастает, и к 21 дню медиана распределения достигает 93 при размахе вариации от 76 до 116, что значимо ($p<0,0003$) выше, чем на 7 день. В опытной группе в те же сроки численность клеток, экспрессирующих TGF- β 1, напротив, последовательно снижается, и к 21 дню медиана их распределения составляет 16 при размахе вариации от 7 до 27, что значимо ($p<0,02$) меньше, чем на 7 день. К месяцу после осуществления ожога численность таких клеток в обеих группах опять значимо ($p<0,0001$) снижается, но в контрольной группе это снижение многократно больше (медиана 21 при размахе вариации от 6 до 53), что значительно и значимо ($p<0,0001$) больше, чем к тому же сроку в экспериментальной группе (медиана 5 при размахе вариации от 0 до 12).

Рисунок 3

Диаграмма, демонстрирующая динамику количества клеток, экспрессирующих TGF- β 1, в роговице кроликов после ожога гидроксидом натрия и перилимбального введения аллогенного биоматериала в контрольной и экспериментальной группе. По оси абсцисс – сроки наблюдения (дни после ожога). По оси ординат – количество клеток, экспрессирующих TGF- β 1

Fig. 3

Diagram showing the dynamics of the number of cells expressing TGF- β 1 in the cornea of rabbits after burn with sodium hydroxide and circumlimbal injection of the Alloplant biomaterial in the control and experimental groups. X-axis- days of observation (after bur). Y-axis - number of cells expressing TGF- β 1



На 90 и 180 сутки после ожога численность клеток, экспрессирующих TGF- β 1, в обеих группах незначительно, но на 90 день еще статистически значимо ($p < 0,006$) снижается до уровня, который значимо ($p < 0,002$ и $p < 0,0001$ в контрольной и экспериментальной группе соответственно) ниже, чем даже в самом начале наблюдений (на 4 день): медиана 4 при размахе вариации от 0 до 8 клеток в контрольной группе и медиана 2 при размахе вариации от 0 до 5 в опытной группе. К 180 суткам после ожога численность таких клеток в обеих группах сохраняется практически на том же уровне: медиана 3 при размахе вариации от 0 до 7 клеток в контрольной группе и медиана 1 при размахе вариации от 0 до 3 в опытной группе. Это некоторое повторное снижение оказалось статистически незначимым ($p > 0,05$). При этом в опытной группе и на 90, и на 180 дни этот минимальный уровень остается значимо ($p < 0,04$ и $p < 0,02$ соответственно) столь же минимального уровня в контрольной группе.

Как известно, трансформирующий фактор роста TGF- β 1 – один из основных противовоспалительных цитокинов, стимулирующий пролиферацию фибробластических клеток и синтез ими коллагена [4]. Обычно избыток TGF- β 1 в очаге воспаления приводит восстановительные процессы к рубцеванию сформировавшегося регенерата [10, 11]. При продолжительном пребывании в воспалительном очаге цитокин, являясь промотором фиброгенеза, также содействует иммунодепрессии макрофагов путем дезактивации их фагоцитарной функции, что тормозит в свою очередь утилизацию клеточного и тканевого воспалительного детрита [12]. Использование аллогенного биоматериала позволяет привлечь в пораженный участок роговицы макрофагальные клетки, очищающие рану. Макрофаги, являясь основными «дирижерами» в клеточных взаимодействиях при воспалении и регенерации, позволяют снизить уровень экспрессии клетками TGF- β 1, что, в свою очередь, способствует эффективному предупреждению рубцово-фиброзных изменений тканей в зоне репарации роговицы [10, 13].

Таким образом, перилимбально введенный аллогенный биоматериал при патологии роговицы вызывает усиление пролиферативной активности эпителиальных клеток роговицы, привлечение фагоцитарных макрофагов (CD68+ клетки) и низкий уровень экспрессии цитокина трансформирующий фактор роста TGF- β 1 (фактор фиброза). Совокупность указанных факторов приводит к быстрой

эпителизации, ускоренной утилизации клеточного и тканевого детрита и ингибированию процесса грубого рубцевания при восстановлении тканей роговицы глаза, поэтому биоматериал «Аллоплант» можно рассматривать как ингибитор рубцевания поврежденной роговицы.

Мусина Л.А. – ORCID ID: 0000-0003-1237-9284
Шакиров Р.Ф. – ORCID ID: 0000-0002-6751-7800
Галимова В.У. – ORCID ID: 0000-0002-1610-108X
Шангина О.Р. – ORCID ID: 0000 0002 0343 1792
Лебедева А.И. – ORCID ID: 0000 0002 9170 2600
Кадыров Р.З. – ORCID ID: 0000-0002-6353-9084

ЛИТЕРАТУРА

1. Галимова В.У., Шакиров Р.Ф. Опыт лечения кератоконуса с использованием трансплантационной технологии «Аллоплант» // Катарактальная и рефракционная хирургия: научно-практический журнал. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 27–30.
2. Галимова В.У., Шакиров Р.Ф., Гареев Е.М. Результаты лечения больных кератоконусом диспергированным в различной степени биоматериалом «Аллоплант» // Офтальмологические ведомости. – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 26–28.
3. Мусина Л.А., Шакиров Р.Ф., Кадыров Р.З., Шангина О.Р. Экспериментально-морфологическое исследование влияния диспергированного аллогенного биоматериала на регенерацию роговицы // Практическая медицина. – 2018. – Т. 16, № 4. – С. 133–139.
4. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 114–123.
5. Oberberger J. Paper strips and rings as simple tools for standartization of experimental eye injuries // Ophthalmol. Res. – 1975. – Vol. 7. – P. 363–366.
6. Холлендер М., Вульф Д. Непараметрические методы статистики. – М.: Финансы и статистика, 1983. – 518 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
8. Багров С.Н. Источники регенерации роговой оболочки глаза // Офтальмол. журн. – 1980. – № 1. – С. 231–233.
9. Гундорова Р.А., Хорошилова-Маслова И.П., Ченцова Е.В., Илатовская Л.В., Ямскова В.П., Романова И.Ю. Применение адгелона в лечении проникающих ранений роговицы в эксперименте // Вест. офтальмол. – 1997. – Т. 113, № 2. – С. 12–16.
10. Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. – Уфа.: Башкортостан, 2000. – 168 с.
11. Rodemann H.P., Binder A., Burger A., Guven N., Loffler H., Bamberg M. The underlying cellular mechanism of fibrosis // Kidney Int Suppl. – 1996. – Vol. 54. – P. 32–36.
12. Зубова С.Г., Данилов А.О., Окулов В.Б. с соавт. Синтез и экспрессия трансформирующего фактора роста-бета активированными макрофагами // Вопросы онкологии. – 1996. – Т. 42, № 5. – С. 80–85.
13. Muldashev E.R., Muslimov S.A., Musina L.A., Nigmatullin R.T., Lebedeva A.I., Shangina O.R., Khasanov R.A. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials // Cell Tissue Bank. – 2005. – Vol. 6, № 2. – P. 99–107.