

Экстраокулярные мышцы mdx–мышей как мишень для клеточной терапии: гистологическая характеристика с использованием компьютерного морфометрического анализа

С.Э. Аветисов¹, А.С. Павлюк^{1,2}, М.А. Стенина², А.А. Федоров¹, Л.П. Кривов²,
Д.С. Николаенко¹, П.Ю. Баранов¹, А.М. Суббот¹, А.И. Тухватулин¹

¹ ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

² Российский государственный медицинский университет, Москва

Extraocular muscles of mdx-mice as a target for cellular therapy: the histological characteristic with use computer morphometrical analysis

S.E. Avetisov¹, A.S. Pavliuk^{1,2}, M.A. Stenina², A.A. Fedorov¹, L.P. Krivov²,
D.S. Nikolaenko¹, P.Yu. Baranov¹, A.M. Subbot¹, A.I. Tuhvatulin¹

¹ Research Institute of Eye Diseases RAMS, Moscow

² Staat Medical University of Russia, Moscow

В исследовании методами компьютерной морфометрии и статистического анализа показано наличие процессов дегенерации и регенерации в экстраокулярных мышцах mdx–мышей, подобраны критерии сравнения степени дегенерации, на основании чего предложено использовать экстраокулярные мышцы mdx–мышей в качестве модели миодегенеративных процессов глазодвигательных мышц человека для экспериментальных разработок и оценки эффективности клеточной и генной терапии.

Ключевые слова: mdx–мыши, экстраокулярные мышцы, биологическая модель, морфометрия.

Введение

Миодегенеративные процессы в экстраокулярных мышцах (ЭОМ) довольно часто развиваются как неблагоприятный исход у лиц, перенесших офтальмогерпес, а также после токсических поражений и травм [1]. У пациентов с такой патологией наблюдаются различные виды косоглазия, трудно поддающиеся лечению. Возможно, что в этих случаях может оказаться эффективной терапия «клеточными препаратами» [2–4].

На данный момент разработка методов клеточной терапии патологии ЭОМ осложняется отсутствием адекватной экспериментальной модели, которую можно было бы использовать для доклинических исследований и оценки терапевтического эффекта. Нами выполнена попытка оценить возможность использования mdx–мышей в качестве экспериментальной модели для разработки подходов клеточной терапии миодегенеративных процессов глазодвигательного аппарата [5].

Мышечная дистрофия у mdx–мышей обусловлена точечной мутацией в 23–м экзоне гена дистрофина, расположенного в X–хромосоме [6]. Миодистрофию у этих мышей следует расценивать как процесс, гомологичный прогрессирующей мышечной дистрофии у людей.

Существует ряд исследований, касающихся вовлечения экстраокулярных мышц mdx–мышей в миодегенеративный процесс. В одних довольно однозначно говорится о том, что ЭОМ несмотря на отсутствие в их структуре дистрофина, особым образом компенсируют этот дефект и остаются

Using computer-assisted morphometrical analysis we show degeneration and regeneration processes in mdx-mouse extraocular muscles. We've also selected statistical criteria for assessment of degeneration rate. Thus we suggest to use mdx-mouse extraocular muscles as experimental biological model of myodegenerative processes in human extraocular muscles in search, development and effectiveness assessment of different ways of treatment, among them cell-based and gene therapy.

Key words: mdx-murines, extraocular muscles, biological model, morphometria.

полностью морфологически и функционально сохранными [7]. Механизм такой компенсации, однако, остается дискуссионным [8, 9]. В других исследованиях было показано, что добавочные ЭОМ и глобулярные слои всех ЭОМ mdx–мышей всё-таки вовлекаются в патологический процесс, хотя и в меньшей степени чем, например, *m. quadriceps femoris* тех же животных [8, 10]. Степень повреждения мышц оценивается в этих исследованиях по экспрессии маркерных белков (дистрофин, утrophин, дистрогликаны, ламинины) методами RT-PCR, иммуногистохимии. Существует и морфологическая характеристика сравниваемых групп мышц. Однако, ресурс, который имеет «классический» гистологический анализ для оценки степени повреждения мышечной ткани, остается использованным не оптимально. Это происходит, в частности, из-за незначительной разницы в оцениваемых количественных показателях, таких, как ядерно-цитоплазматическое соотношение, площадь мышечных волокон и т. д., различия между которыми тяжело учесть без применения адекватного статистического анализа [8, 9]. Численные параметры используются, но, в большинстве случаев, только для описания отдельных тканей, а не для сравнения их друг с другом [7, 9].

Нашей целью было охарактеризовать гистологические особенности экстраокулярных мышц mdx–мышей и мышечной линии C57Bl в сравнении с *m. quadriceps femoris* тех же животных методами компьютерной морфометрии и статистического анализа, для:

- выявления и оценки степени поражения этой группы мышц;
- выявления информативных показателей, характеризующих глубину и тяжесть развития дегенеративных процессов;
- оценки возможности использования ЭОМ mdx-мышей в качестве модели при разработке клеточных технологий для лечения дегенеративных процессов ЭОМ.

Нами были отобраны морфометрические критерии для оценки процессов дегенерации и регенерации в ЭОМ. Это – число ядер в мышце, число мышечных волокон в мышце, CNI – центральный ядерный индекс и CVA – гетерогенность площади поперечного сечения мышечных волокон в мышце.

Материал и методы

Исследование проведено на самцах mdx-мышей и мышцах линии C57Bl в возрасте 10–12 мес. Мышей содержали в стандартных условиях, в соответствии с этическими нормами и правилами обращения с лабораторными животными.

После декапитации животного глазные яблоки с ЭОМ отделяли от стенок орбиты и век и фиксировали в 10% растворе нейтрального (pH = 7,3) формалина, аналогично обрабатывали *m. quadriceps femoris*. Весь материал подвергали стандартной гистологической обработке и изготавливали срезы толщиной 4 мкм. Окраску проводили гематоксилином и эозином.

Морфометрические показатели оценивали методами полуавтоматического морфометрического анализа с использованием программы «Флюороденситоморфометрия» (ЗАО «МеКоС»). Выявляли:

- площадь мышцы на поперечном срезе (соединительная ткань, мышечные волокна);
- площадь соединительной ткани на поперечном срезе мышцы;
- площадь мышечных волокон на поперечном срезе мышцы;
- доля соединительной ткани в мышце (отношение площади соединительной ткани ко всей площади мышцы на поперечном срезе);
- площадь мышечного волокна на поперечном срезе мышцы;
- число мышечных волокон в мышце на поперечном срезе;
- число ядер в на поперечном срезе мышечного волокна;
- число ядер на исследуемом поперечном срезе мышцы;
- плотность ядер в мышце (количество ядер на единицу площади мышцы);
- плотность ядер в мышечных волокнах (количество ядер на единицу площади мышечных волокон в мышце);
- центральный ядерный индекс (CNI) (рассчитывается как отношение числа мышечных волокон с одним и более ядром в центре к общему числу мышечных волокон, исключая мышечные волокна без ядер в поперечном сечении), характеризующий долю регенерировавших волокон;
- гетерогенность площади поперечного сечения мышечных волокон в мышце (CVA); рассчитывается как коэффициент вариации площади поперечного сечения мышечных волокон. Этот признак используется для оценки интенсивности процессов регенерации скелетных мышц: чем больше отличаются отдельные мышечные волокна по своим размерам, тем сильнее выражены процессы восстановления [11].

Для оценки значимости различий средних значений использовали *t*-критерий Стьюдента (и его модификации) при уровне значимости $P = 0,01$.

Результаты и обсуждение

Гистологические данные о строении изученных мышц страдают известной скупостью и не дают существенной информации для сравнительного анализа (рис. 1). Без дополнительных исследований по гистологическим препаратам нельзя судить о наличии достоверных различий между исследуемыми группами. Однако при морфометрическом и последующем статистическом анализе выявлено, что для ЭОМ, также как и для *m. quadriceps femoris* mdx-мышей характерно статистически значимое изменение некоторых морфометрических признаков относительно контрольной группы мышечной линии C57Bl, (табл.). Так в мышцах mdx-мышей, снижаются значения таких абсолютных признаков, как:

- площадь мышцы на поперечном срезе – в 3 раза для ЭОМ и в 6 раз для *m. quadriceps femoris*;
- площадь соединительной ткани на поперечном срезе мышцы – в 3 раза для ЭОМ и в 8 раз для *m. quadriceps femoris*;
- площадь мышечных волокон на поперечном срезе мышцы – в 2 раза для ЭОМ и в 5 раз для *m. quadriceps femoris*;
- число ядер на исследуемом поперечном срезе мышцы – в 2 раза для ЭОМ и в 2 раза для *m. quadriceps femoris*;
- число мышечных волокон в мышце – в 3 раза для ЭОМ и в 6 раз для *m. quadriceps femoris*.

Как было показано в исследовании, посвященном изучению процессов дегенерации и регенерации поперечно-полосатой мускулатуры, такое уменьшение площади мышцы, площади отдельных волокон и др. свидетельствуют о дегенеративных процессах в ткани [11]. Таким образом, нами показано наличие процессов дегенерации в ЭОМ, также как и в *m. quadriceps femoris* mdx-мышей.

В ЭОМ mdx-мышей увеличиваются такие относительные признаки как:

- центральный ядерный индекс (CNI);
- коэффициент вариации площади поперечного сечения мышечных волокон (CVA).

Такие изменения по данным тех же авторов [11] говорят о наличии процессов регенерации. Поскольку в исследованных ЭОМ mdx-мышей эти изменения присутствуют, следует констатировать протекание в них и процессов регенерации.

Для *m. quadriceps femoris* mdx-мышей также статистически значимо увеличивается среднее количество ядер в мышечном волокне, плотность ядер в мышце и мышечных волокнах и значимо уменьшается доля соединительной ткани в мышцах относительно контрольной группы мышечной линии C57Bl, что позволяет определить дегенеративные и регенераторные процессы в мышечной ткани *m. quadriceps femoris* mdx-мышей. Для ЭОМ достоверных изменений этих признаков не выявлено.

При анализе распределения величин поперечного сечения мышечных волокон выявлено увеличение доли волокон с большой площадью в мышцах (*m. quadriceps femoris* и экстракулярных мышц) у mdx-мышей по сравнению с линией C57Bl (рис. 2, 3).

Представляется целесообразным предположить, что увеличение количества мышечных волокон с большой площадью является одним из компенсаторных механизмов.

Мы считаем, что абсолютные признаки, такие, как площадь мышцы, площадь соединительной ткани в мышце, площадь мышечных волокон в мышце, напрямую зависят от факторов, которые трудно учесть (уровень и направление среза, расположение мышцы), а потому все эти признаки следует исключить из критериев для оценки степени дистрофии.

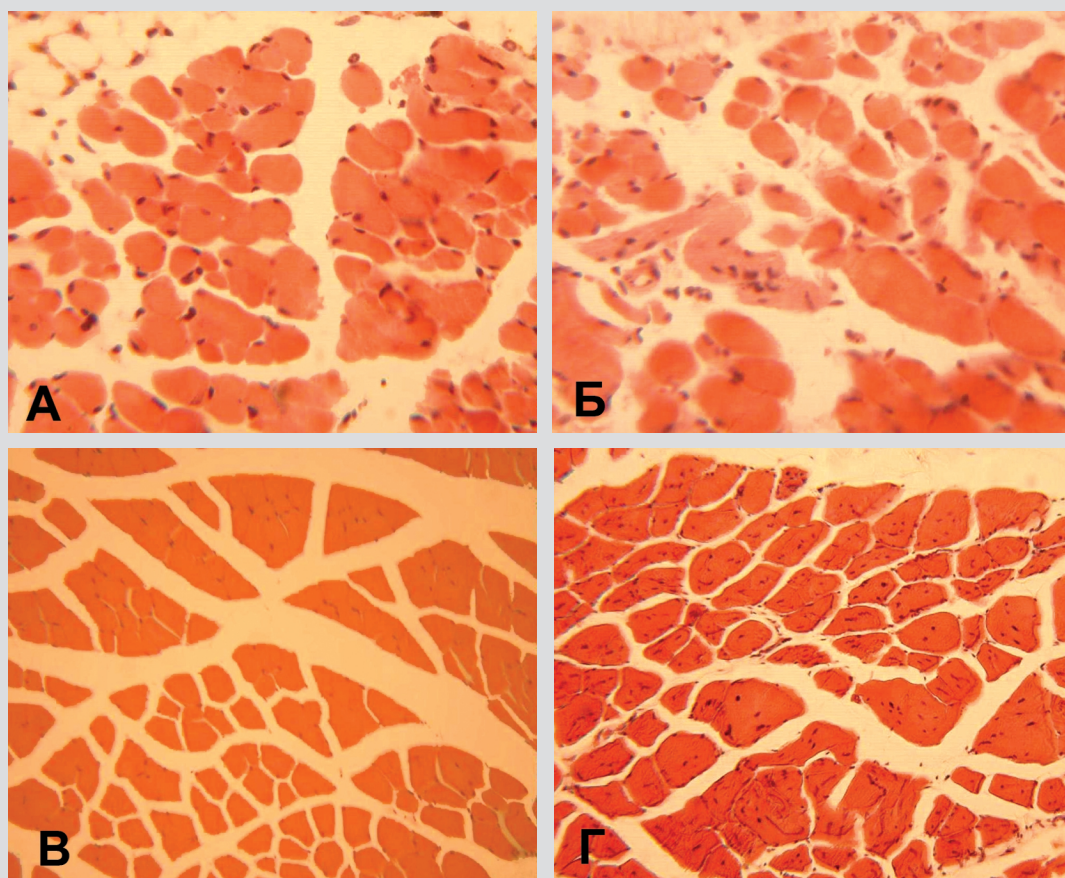


Рис. 1. Поперенные срезы исследованных мышц:
 А – экстраокулярная мышца мыши линии C57Bl; Б – экстраокулярная мышца mdx-мыши;
 В – *m. quadriceps femoris* мыши линии C57Bl; Г – *m. quadriceps femoris* mdx-мыши.
 Окраска: гематоксилин и эозин. А, Б – $\times 250$; В, Г – $\times 250$

Гистоморфометрическая характеристика экстраокулярных мышц и *m. quadriceps femoris* mdx-мышей

Параметр, размерность	Экстраокулярные мышцы		<i>m. quadriceps femoris</i>	
	C57Bl	mdx	C57Bl	mdx
Площадь мышцы (на поперечном срезе)	39311 $\pm$ 25998	14138 $\pm$ 4666*	299631 $\pm$ 63524	53561 $\pm$ 40453*
Площадь соедин. ткани	17269 $\pm$ 12853	5597 $\pm$ 2500*	117135 $\pm$ 21908	13894 $\pm$ 13115*
Площадь мыш. волокон в мышце (на поперечном срезе)	22042 $\pm$ 14307	8542 $\pm$ 2511*	182496 $\pm$ 21908	39667 $\pm$ 28699*
Число ядер в мышце	81 $\pm$ 42	36 $\pm$ 13*	146 $\pm$ 35	90 $\pm$ 62*
Число мыш. волокон в мышце	69 $\pm$ 44	21 $\pm$ 8*	90 $\pm$ 20	16 $\pm$ 13*
Площадь мыш. волокна (на поперечном срезе)	293 $\pm$ 133	450 $\pm$ 188	1574 $\pm$ 652	2200 $\pm$ 1119
Ср. кол-во ядер на мыш. волокно	1,3 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,6	2 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 1,4
Доля соединительной ткани в мышце, %	42,8 $\pm$ 9,1	38,6 $\pm$ 7,2	39,1 $\pm$ 7,3	23,1 $\pm$ 9,7
Плотность ядер в мышце	2316 $\pm$ 715	2570 $\pm$ 373	489 $\pm$ 115	1866 $\pm$ 767
Плотность ядер в мыш. волокнах	4143 $\pm$ 1465	4276 $\pm$ 976	798 $\pm$ 131	2374 $\pm$ 693
CNI, %	1,45	4,51*	5,33	87,75*
CVA	0,52	0,58*	0,44	0,64*

Примечание: * – различия статистически значимы.

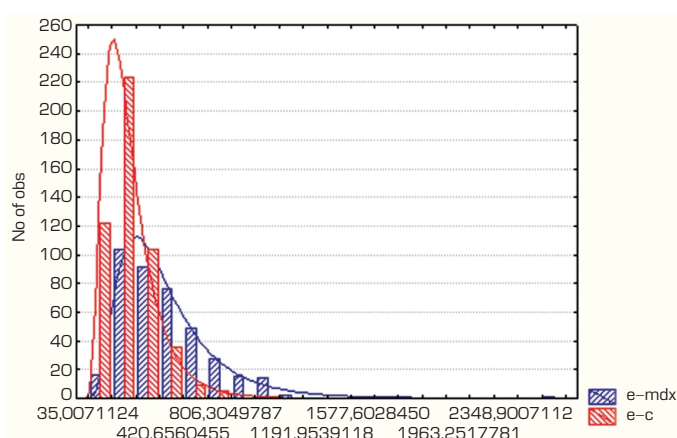


Рис. 2. Гистограмма площади поперечного сечения мышечных волокон в экстраокулярных мышцах мышей линии C57Bl и mdx-мышей

Таким образом, на основании статистически подтвержденных различий между показателями, измеренными у контрольных C57Bl и mdx-мышей, для оценки миодистрофии из всех предложенных показателей можно выбрать следующие:

- число ядер на исследуемом поперечном срезе мышцы;
- число мышечных волокон на поперечном срезе мышцы;
- CNI — центральный ядерный индекс;
- CVA — коэффициент вариации площади поперечного сечения мышечных волокон.

По этим признакам обнаружены значимые различия между группой mdx-мышей и мышей C57Bl как в экстраокулярных мышцах, так и в *m. quadriceps femoris*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Каспаров А.А. Офтальмогерпес. М.: Медицина; 1994.
2. Ярыгин В.Н., Сухих Г.Т., Ситников В.Ф. и др. Ксенотрансплантация эмбриональных предшественников миогенеза человека для коррекции дистрофинопатии у мышей с наследственной миодистрофией. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2003; 136 (7): 100–2.
3. Ярыгин В.Н., Стенина М.А., Булякова Н.В. и др. Восстановление икроножной мышцы мышей mdx разного возраста после травмы и при имплантации ксеногенной мышечной ткани. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006; 142 (8): 216–8.
4. Сукач А.М. Перспективы использования генной и клеточной терапий для лечения мышечных дистрофий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 2 (4): 44–50.
5. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 1998; 279: 1528–30.

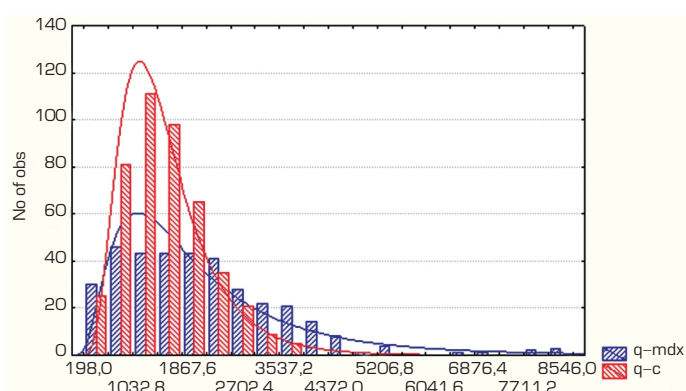


Рис. 3. Гистограмма площади поперечного сечения мышечных волокон в *m. quadriceps femoris* мышей линии C57Bl и mdx-мышей

Анализ гистологических препаратов, проведенный с использованием методов объективной морфометрии и статистики, свидетельствует о том, что в экстраокулярных мышцах mdx-мышей имеют место процессы дегенерации и регенерации меньшей степени выраженности, чем в *m. quadriceps femoris*, что, в целом, согласуется с существующими литературными данными о том, что ткани ЭОМ являются структурно дефектными, но имеют механизмы компенсации [7, 8, 10].

Таким образом, нами установлено, что экстраокулярные мышцы mdx-мышей можно использовать в качестве экспериментальной модели миодистрофических процессов глазодвигательных мышц, в частности, для разработки методов клеточной и генной терапии миодистрофий в офтальмологии.

6. Bulfield G., Siller W.G. et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. PNAS USA 1984; 81: 1189–92.
7. Khurana T.S., Prendergast R.A., Alameddine H.S. et al. Absence of Extraocular Muscle Pathology in Duchenne's Muscular Dystrophy: Role for Calcium Homeostasis in Extraocular Muscle Sparing. J. Exp. Med. 1995; 182: 467–75.
8. Porter J.D., Rafael J.A., Ragusa R.J. et al. The sparing of extraocular muscle in dystrophinopathy is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. J. Cell Science 1998; 111: 1801–11.
9. Porter J.D., Merriam A.P., Sangeeta K. et al. Constitutive properties, not molecular adaptations, mediate extraocular muscle sparing in dystrophic mdx mice. FASEB J. 2003; 17: 893–5.
10. Budak M.T., Bogdanovich S., Wiesen-Martin H.J. et al. Layerspecific differences of gene expression in extraocular muscles identified by laser-capture microscopy. Physiol. Genomics 2004; 20: 55–65.
11. Chambers R.L., McDennot J.C. Molecular basis of skeletal muscle regeneration. Can. J. Appl. Physiol. 1996; 21 (3): 155–84.

Поступила 17.06.2008