

© Н. В. Булякова, В. С. Азарова, 2013  
УДК 611.74-001-003.93:599.323.4

*Н. В. Булякова и В. С. Азарова*

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЦ ПРИ ТРАВМЕ, ВОЗДЕЙСТВИИ He-Ne ЛАЗЕРА И АЛЛОПЛАСТИКЕ МЫШЕЧНОЙ ТКАНЬЮ ОТ ЖИВОТНОГО ТОГО ЖЕ ВОЗРАСТА

Лаборатория морфологических адаптаций позвоночных (зав. — д-р биол. наук О. Ф. Чернова), Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва

Исследовано восстановление травмированных мышц у беспородных молодых (1 мес), взрослых (3–4 мес) и старых (24–30 мес) крыс-самцов (по 24 особи в каждой группе) при аллопластике области травмы мышечной тканью животного того же возраста в условиях имплантации необлученной лазером мышечной ткани в область травмы облученной лазером мышцы (1-я серия) и, наоборот, имплантации облученной лазером мышечной ткани в область травмы необлученной лазером мышцы (2-я серия). Показано, что в каждой возрастной группе в 1-й и 2-й сериях аллогенная мышечная ткань способна к регенерации. При этом масса регенератов и доля мышечной ткани в них у животных в 1-й серии имели тенденцию к увеличению по сравнению с таковыми во 2-й серии. Аллопластика мышечной тканью животного того же возраста у молодых крыс была эффективнее, чем у старых.

**Ключевые слова:** мышца, травма, возраст, аллопластика, He-Ne лазер

Метод тканевой терапии, позволяющий закрывать обширные дефекты после травмы, широко применяется в регенеративной биологии и медицине [12]. В скелетных мышцах при тяжелых повреждениях формируется плотный соединительнотканый рубец [4]. Аутотрансплантация в область травмы мышечной ткани, извлеченной в момент операции из другой мышцы, улучшает регенерацию [6]. При этом дефект заполняется мышечные волокна, источником которых является имплантированная мышечная ткань. Однако в данном случае организм подвергается дополнительной травме. Пластические возможности генетически чужеродных тканей ограничены, и для длительного сохранения имплантатов требуются использование иммунодепрессантов и определенная подготовка аллоплантов. Широкое применение в области трансплантологии получило низкоинтенсивное лазерное излучение [13], которое повышает регенерационную способность тканей, снижает дегенеративные изменения после травмы, усиливает пролиферацию клеток, стимулирует неогенез, в том числе за счет резервных капилляров [10].

Цель данной работы — изучить восстановление травмированных мышц у 1-месячных, взрослых и старых крыс при аллопластике области травмы мышечной тканью животного того же возраста в различных условиях предварительного лазерного облучения.

Материал и методы. Исследования проведены на беспородных крысах-самцах в возрасте 1, 3–4 и 24–30 мес (по 24 животных) с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные каждой возрастной группы были разделены на 2 подгруппы. У крыс 1-й подгруппы (n=12) обе задние конечности в области проекции икроножных мышц в течение 2 нед подвергали предварительному курсовому воздействию лазерных лучей. Крыс 2-й подгруппы (n=12) не облучали. На следующий день после лазерного воздействия между подгруппами облученных и необлученных животных была проведена перекрестная аллопластика. У крыс под наркотическим наркозом (по 0,04 г/кг) в асептических условиях разрешили кожу, кроющую мышцу и полностью перерезали только правые икроножные мышцы, сохраняя неповрежденными нервно-сосудистый пучок, лежащий на поверхности мышцы, и подлежащий малоберцовый нерв. Затем в область мышечной травмы правых икроножных мышц реципиента имплантировали измельченную мышечную ткань, извлеченную из левой икроножной мышцы донора. После операции кроющую мышцу и кожу на обеих конечностях зашивали хирургическим шелком. В результате 1-я серия опытов состояла в том, что крысам всех исследуемых возрастных групп в предварительно облученную лазером перерезанную правую икроножную мышцу имплантировали некоторое количество необлученной лазером измельченной мышечной ткани, извлеченной из левой икроножной мышцы интактной крысы-донора. Во 2-й серии опытов животным также всех возрастных групп, наоборот, в необлученную лазером перерезанную правую икроножную мышцу имплантировали облученную лазером измельченную мышечную ткань, извлеченную из левой предварительно облученной икроножной мышцы крысы-донора. Изучали только правые регенерирующие мышцы. Поскольку в каждой серии опытов одно и то же животное было и донором, и реципиентом, генети-

### Сведения об авторах:

Булякова Нелли Васильевна (e-mail: bulyakova38@mail.ru), Азарова Валентина Сергеевна (e-mail: vazarova@mail.ru), лаборатория морфологических адаптаций позвоночных, Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, 119071, Москва, Ленинский пр., 33

ческие различия у животных обеих серий, т. е. варианты тканевой несовместимости в обеих сериях, должны быть одинаковы. Условия воздействия He-Ne лазера (установка ОКГ-12, Россия): длина волны 632,8 нм, лазерный луч был расфокусирован с помощью линзы, диаметр поля облучения 2–2,5 см, плотность мощности составляла 2,5–3 мВт/см<sup>2</sup>. Облучение проводили в режиме: 10 экспозиций по 3 мин в течение 14 сут за исключением выходных дней, суммарно в дозе 4,5–5,4 Дж/см<sup>2</sup> на каждую конечность. Регенераты правых икроножных мышц исследовали через 7, 14 и 30 сут после аллопластики. Мышцы фиксировали в смеси Карнуа, срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали гематоксилином по Рего с докраской по Маллори. О качественных показателях восстановительного процесса в икроножных мышцах судили по изменению относительной массы регенератов (доля от массы тела), гистологической структуре восстанавливающихся мышц и количественному соотношению мышечной и соединительной тканей в 30-суточных регенератах (по площади, занимаемой этими тканями на гистологических срезах, доле от общей площади среза).

Кроме того, до операции у животных всех возрастных групп — интактных и после 10 сеансов лазерного воздействия, определяли относительную массу икроножной мышцы, принимая массу животного за 100%. Поскольку в группе 1-месячных крысят последних начинали облучать лазером с 2-недельного возраста, массу икроножных мышц определяли у 2-недельных крысят и к моменту операции (к 1-месячному возрасту) без лазерного воздействия и после его завершения (n=12). В группах 3–4-месячных и 24–30-месячных крыс было изучено по 8 животных. Животных выводили из опыта инъекцией больших доз нембутала. Количественные данные обрабатывали статистически, и различия средних величин оценивали по критерию Стьюдента.

**Результаты исследования. 1-месячные крысята.** В 1-й серии опытов через 7 сут в перерезанной икроножной мышце проксимальная и дистальная культы укорачивались, расширялись септы. Лишь единичные мышечные волокна находились в ишемическом состоянии (были темно окрашены). Область травмы была заполнена грануляционной тканью с участками жизнеспособной аллогенной мышечной ткани, в которой формировались многоядерные миотубы, наблюдались фигуры митоза в клетках, похожих на миобласты (рис. 1, а, б).

Отмечалась умеренная лимфоидная инфильтрация. На периферии аллопланта встречались участки компактно расположенных параллельно ориентированных мышечных волокон с небольшим количеством миофибрилл, имеющих отчетливую поперечную исчерченность. Возможно это сохранившиеся фрагменты аллогенной мышечной ткани, пережившие состояние ишемии. По краю культей наблюдался активный рост мышечной ткани реципиента.

На 14-е сутки обе культы увеличивались. Регенерационная перестройка аллогенной мышечной ткани заканчивалась. В области травмы отмечались многочисленные регенерировавшие мышечные волокна, грануляционная ткань с разветвленной сетью капилляров. От обеих культей продолжался рост мышечной ткани в сторону дефекта.

Через 30 сут область травмы практически полностью заполнялась регенерирующей мышечной тканью.

Во 2-й серии опытов через 7 сут также наблюдались нарушения в структуре обеих мышечных культей. Многие мышечные волокна и расширенные септы имели волнистый ход. Очагов сохранившейся аллогенной мышечной ткани было меньше, чем в 1-й серии, но в них также происходила регенерационная перестройка. Наблюдалась инфильтрация лимфоидными клетками. По краю обеих мышечных культей были видны растущие миотубы.

Через 14 и 30 сут величина обеих мышечных культей и их морфологическая структура восстанавливались. В области травмы преобладали регенерирующие мышечные волокна. Встречались клетки лимфоидной ткани.

**Взрослые крысы (3–4-месячные).** В 1-й серии опытов через 7 сут в мышечных регенератах развивался экссудативный отек тканей. При отсутствии достаточного продольного натяжения расширенные септы и многие мышечные волокна имели волнистый ход. На концах перерезанных мышечных волокон появлялись вакуоли, скапливались мышечные ядра, но роста мышечной ткани в сторону дефекта не наблюдалось. Регенерация аллогенной мышечной ткани происходила медленнее, чем у молодых крыс. Встречались еще начальные стадии регенерационной перестройки: фрагменты аллогенных мышечных волокон просветлялись, миофибриллы распадались на глыбки, лизировались, а по периферии мышечных волокон оставались клетки с крупным овальным ядром, похожие на миобласты (см. рис. 1, в). Формировались многоядерные миосимпласты, тонкие мышечные волокна (см. рис. 1, г). Были видны макрофаги, моноциты и лимфоциты.

Через 14 сут структура мышечных культей восстанавливалась, хотя септы были еще расширены. Область травмы заполнялась регенерирующими мышечными волокнами и грануляционной тканью с разветвленной сетью капилляров. Усиливалась регенерация мышечной ткани реципиента.

Через 30 сут область поперечной перерезки примерно на  $\frac{2}{3}$  состояла из регенерирующей мышечной ткани с умеренной лейкоцитарной инфильтрацией.

Во 2-й серии опытов в течение 2 нед постепенно усиливалась регенерация аллогенной мышечной ткани и мышечной ткани реципиента. К концу наблюдения по краю культей, особенно проксимальной, отмечались плотно переплетающиеся регенерирующие толстые и тонкие мышечные волокна с повышенной лейкоцитарной инфильтрацией, что может указывать на присутствие элементов аллогенной мышечной ткани. В центре области травмы располагались тонкие регенери-

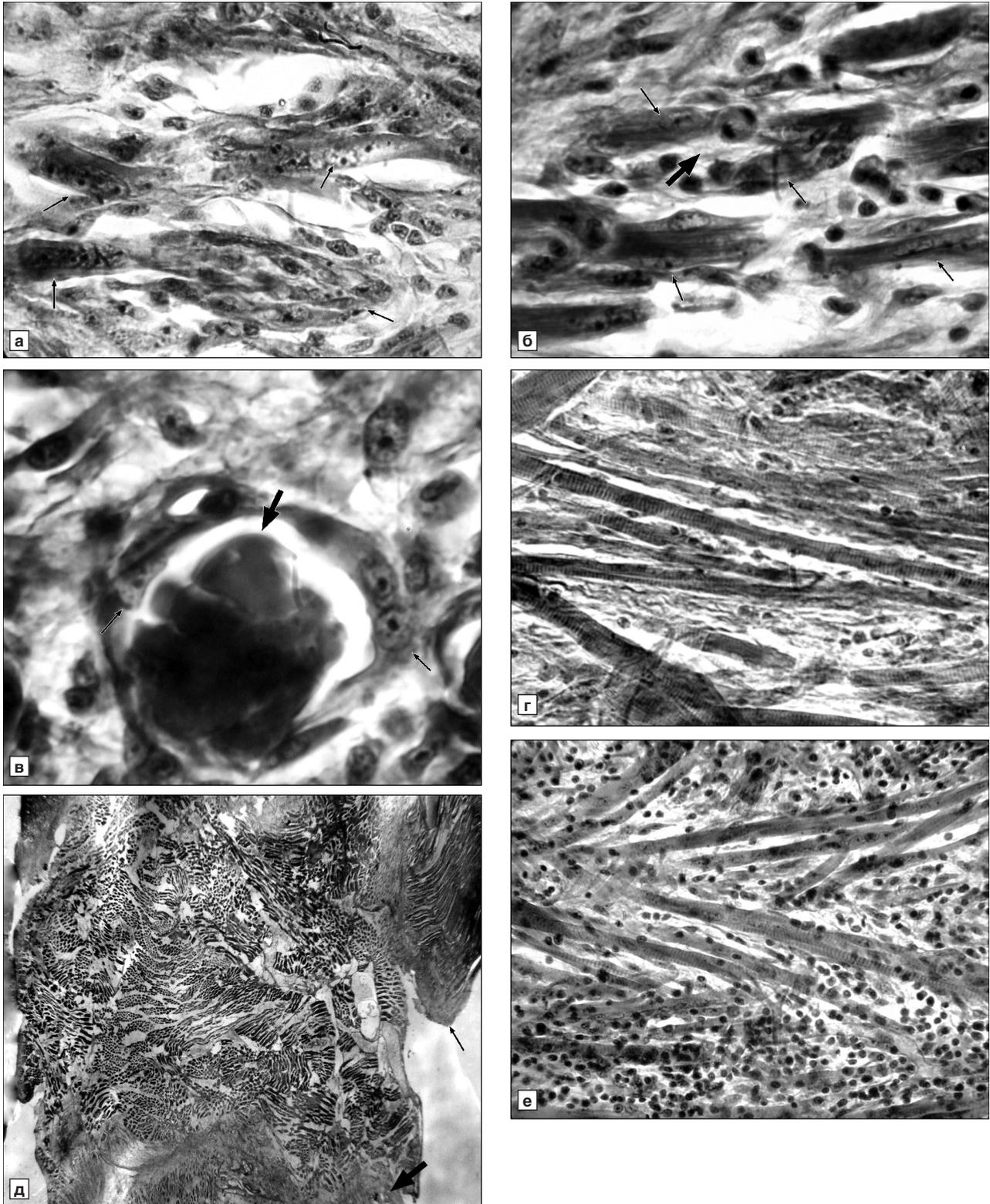


Рис. 1. Икроножные мышцы 3–4-месячных (в, г) и 24–30-месячных (д, е) крыс в условиях аллопластики мышечной тканью от животного того же возраста.

а — образующиеся аллогенные многоядерные миосимпласмы (стрелки) из аллогенной мышечной ткани на 7-е сутки регенерации; б — тонкие аллогенные миотубы (тонкие стрелки), делящаяся клетка, возможно миобласт, сливающийся с миотубой (толстая стрелка) на 7-е сутки регенерации; в — аллогенное мышечное волокно с дегенерацией миофибрилл (толстая стрелка), формирующиеся миобласты по периферии волокна (тонкие стрелки) на 7-е сутки регенерации; г — регенерирующие в области травмы аллогенные мышечные волокна (7-е сутки после операции); д — темноокрашенные фрагменты аллогенной мышечной ткани, проксимальная (тонкая стрелка) и дистальная (толстая стрелка) культя перерезанной икроножной мышцы на 7-е сутки регенерации; е — аллогенные мышечные волокна в области травмы, повышенная лейкоцитарная инфильтрация (14-е сутки после операции). Ув.: а, б — 400; в — 600; г, е — 200; д — 25. Окраска гематоксилином и по Маллори

рующие мышечные волокна и небольшие участки рыхлой волокнистой соединительной ткани с единичными жировыми клетками.

*Старые крысы (24–30-месячные).* Имплантация аллогенной мышечной ткани оказывала агрессивное влияние на мышечную ткань реципиента. Диаметр мышечных волокон уменьшался, пространство между ними увеличивалось. Отмечались лизис и распад миофибрилл, появление вакуолей. В результате потери некоторого количества мышечной ткани обе мышечные культуры укорачивались, а область травмы значительно расширялась. Существенно замедлялся процесс регенерации аллогенной мышечной ткани. Через 7 сут в обеих сериях опытов в области травмы располагалось еще большое количество темноокрашенных фрагментов измельченной аллогенной мышечной ткани, склеенных нитями фибрина (см. рис. 1, д).

По краю аллопланта появлялись нейтрофилы. На 14-е сутки в сохранившейся своей жизнеспособность аллогенной мышечной ткани отмечались единичные очаги регенерирующих ориентированных в разных направлениях тонких аллогенных мышечных волокон с обильной инфильтрацией лимфоидными клетками (см. рис. 1, е).

Через 30 сут область травмы была заполнена соединительной тканью с жировым перерождением и тонкими мышечными волокнами с интенсивной инфильтрацией лимфоцитами.

Данные морфометрического анализа мышечных регенератов представлены на рис. 2.

К концу наблюдения (30 сут) у молодых, взрослых и старых крыс в обеих сериях опытов масса мышечных регенератов была меньше, чем масса мышц до операции ( $P < 0,01$ ). Вместе с тем, в каждой возрастной группе в 1-й серии опытов наблюдалась тенденция к увеличению средних величин изученных показателей по сравнению с таковыми во 2-й серии. Более полным восстановлением мышц при обоих условиях предварительного воздействия лазерного излучения было у 1-месячных крысят. К моменту аллопластики масса регенератов у молодых облученных крыс-реципиентов увеличивалась с  $0,410 \pm 0,006$  до  $0,440 \pm 0,010\%$  ( $P < 0,01$ ), а в 30-суточных регенератах сохранялось наибольшее количество мышечной ткани ( $88,0 \pm 2,4\%$  в 1-й серии и  $84,1 \pm 1,8\%$  во 2-й серии) по сравнению с таковой у взрослых и старых животных.

**Обсуждение полученных данных.** При имплантации необлученной лазером мышечной ткани в область травмы облученной лазером мышцы (1-я серия) и, наоборот, имплантации облученной лазером мышечной ткани в область травмы необлученной лазером мышцы (2-я серия) предварительное воздействие лазерного излучения положительно влияло на жизнеспособность аллогенной мышечной ткани и регенерацию

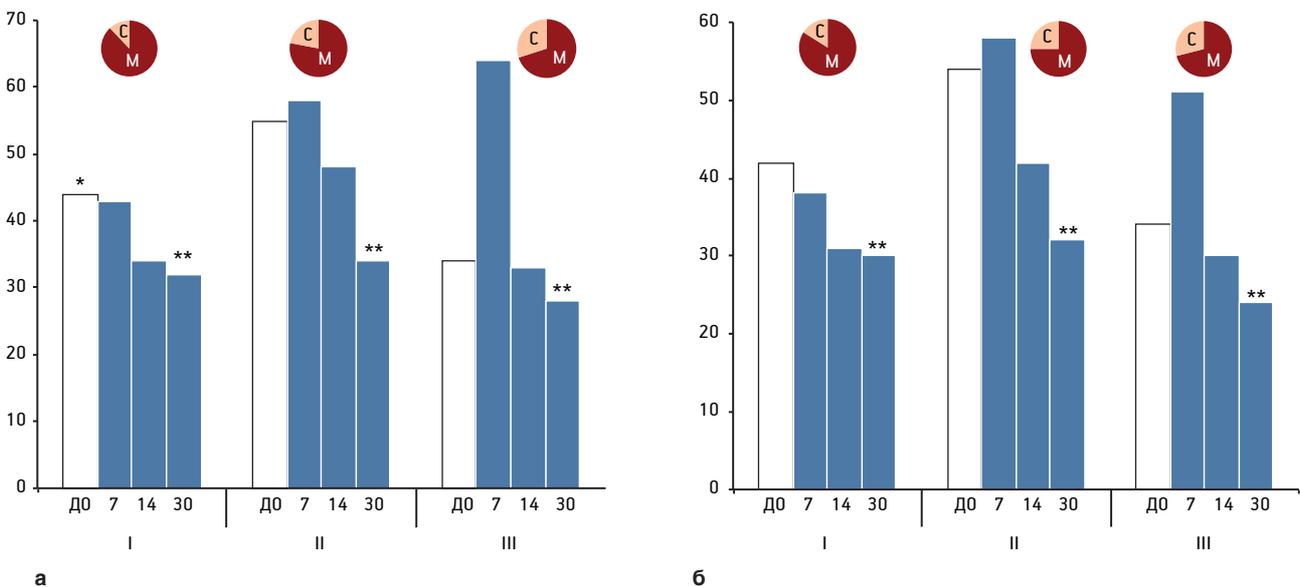


Рис. 2. Морфометрическая характеристика мышечных регенератов у 1-месячных крысят (I), взрослых (II) и старых крыс (III).

а — 1-я серия опытов: имплантация необлученной лазером мышечной ткани в облученную мышцу реципиента; б — 2-я серия опытов: имплантация облученной лазером мышечной ткани в необлученную мышцу реципиента. По оси абсцисс: ДО — до операции и сроки после аллопластики (сут); по оси ординат — масса регенерата (икроножной мышцы, %) по отношению к массе тела животного, принятой за 100; одна звездочка — различия значимы между показателями у крыс 1-й и 2-й серий опытов до операции; две звездочки — различия значимы между массой мышц в 30-суточном регенерате до операции с таковой в других возрастных группах. Круги — соотношение площади, занимаемой на срезах мышечной (М) и соединительной (С) тканями в 30-суточных регенератах

мышечной ткани реципиента. Результаты согласуются с нашими данными, полученными ранее [1, 2]. На присутствие элементов аллогенной мышечной ткани указывала лимфоидная инфильтрация пространства между тонкими дифференцированными мышечными волокнами в области пластики 30-суточных регенератов. Не исключено формирование гибридных мышечных волокон. Аллогенные миобласты могут сливаться с регенерирующими мышечными волокнами реципиента [11, 14]. Чем моложе животное, тем выше были темпы регенерационной перестройки аллогенной мышечной ткани. Наблюдалась тенденция к увеличению массы регенератов и количества мышечной ткани в них. У старых крыс, возрастной особенностью которых является замедление темпов регенерации и снижение качественных показателей восстановленных мышц [9], положительный эффект лазерного воздействия был выражен в меньшей степени.

Кроме того, в 1-й серии опытов отмечалось пролонгированное сохранение большего количества аллогенной мышечной ткани. Это указывает на возможное снижение реакции иммунной системы реципиента на трансплантацию генетически чужеродной ткани, по крайней мере, в начальные сроки регенерации. Имеются данные, что при некоторых условиях лазерное излучение может снижать активность иммунной системы [3, 5, 8]. Во 2-й серии опытов сохранение облученной лазером регенерирующей аллогенной мышечной ткани возможно определяется изменением ее иммунного статуса. Известно, что лазерное излучение может влиять на антигенность и иммуногенность тканей, свойства белков плазмолеммы лимфоцитов и их взаимодействие с чужеродной тканью [7].

Итак, предварительное воздействие излучения He-Ne лазера на мышцы реципиента или имплантируемую донорскую мышечную ткань оказывало положительное влияние на жизнеспособность мышечного аллопланта и регенерацию мышц реципиента в целом. Аллопластика мышечной тканью животного того же возраста у молодых и взрослых крыс была более эффективна, чем у старых животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Булякова Н. В. и Азарова В. С. Структурные и функциональные особенности мышечных гомотрансплантатов, развивающихся в различных условиях лазерного облучения. Цитология, 2000, т. 42, № 1, с. 27–31.
- Булякова Н. В. и Азарова В. С. Морфофункциональные особенности тимуса и мышечных регенератов при воздействии лазерного излучения и аллопластики мышечной ткани взрослого животного в область мышечной травмы. Изв. РАН. Серия биологическая, 2009, № 1, с. 18–26.
- Глушкова О. В., Новоселова Е. Г., Черепков Д. А. и др. Эффекты облучения разных участков кожи мышей-опухо-

лениселей низкоинтенсивным лазерным светом. Биофизика, 2006, т. 51, № 1, с. 123–135.

- Данилов Р. К. Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб., Изд-во ВМедА им. С. М. Кирова, 2008.
- Кончугова Т. В., Першин С. Б. и Миненков А. А. Иммунная супрессия при локальных воздействиях низкоэнергетическим лазерным излучением инфракрасного диапазона. Вopr. курортол., 1992, № 3, с. 57–59.
- Попова М. Ф. Радиочувствительность и стимулирующие свойства регенерирующих тканей млекопитающих. М., Наука, 1984.
- Торопова Л. А. и Федюкович Л. В. Экспериментальное обоснование оптимальной последовательности воздействия лазерного излучения на организм. Новости оториноларингологии и логопатологии, 2001, № 2, с. 55–57.
- Улащик В. С. Иммуномодулирующее действие лечебных физических факторов. Медицинские новости, 2006, № 11, с. 8–13.
- Carosio S., Berardinelli M. G., Aucello M. and Musaro A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. Ageing Res. Rev., 2011, v. 10, № 1, p. 35–42.
- Gao X. and Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. J. Biomed. Sci., 2009, v. 16, № 1, p. 4–20.
- Heslop L., Beauchamp J. R., Tajbakhsh S. et al. Transplanted primary neonatal myoblasts can give rise to functional satellite cells as identified using the Myf5<sup>nlacZ</sup> mouse. Gene Ther., 2001, v. 8, № 10, p. 778–783.
- Stocum D. L. Regenerative biology and medicine. N-L, Acad. Press, 2006.
- Walsh L. J. The use of lasers in implantology: an overview. J. Oral. Implantol., 1992, v. 18, № 4, p. 335–340.
- Watt D. J., Lambert K., Morgan J. E. et al. Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. J. Neurol. Sci., 1982, v. 57, p. 319–331.

Поступила в редакцию 04.01.2013  
Получена после доработки 01.04.2013

#### AGE PECULIARITIES OF THE MUSCLE REGENERATION AFTER INJURY, EXPOSURE TO HE-NE LASER AND ALLOPLASTY WITH MUSCLE TISSUE FROM THE ANIMAL OF THE SAME AGE

*N. V. Bulyakova and V. S. Azarova*

The recovery of the injured muscles were studied in young (aged 1 month), adult (aged 3–4 months) and old (aged 24–30 months) outbred male rats (24 animals in each group) after alloplasty of the injured area with the muscle tissue taken from the animal of the same age under the conditions of implantation of muscle tissue, non-irradiated by laser, into the area of injury of the muscle irradiated by laser (1st series) and vice versa, implantation of the muscle tissue irradiated by laser, into the area of injured non-irradiated muscle (2nd series). It is shown that in each age group in the 1st and the 2nd series, the allogeneic muscle tissue is capable of regeneration. The regenerate mass and the proportion of muscle tissue in them tended to be greater in the animals in the 1-series, as compared to those in the 2nd series. Alloplasty with the muscle tissue of the animal of the same age was more effective in young rats than in the old ones.

**Key words:** *muscle, injury, age, alloplasty, He-Ne laser*

Laboratory of Morphological Adaptations of Vertebrates, RAS  
A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow