

РЕПАРАТИВНЫЙ РАБДОМИОГИСТОГЕНЕЗ У МЫШЕЙ, МУТАНТНЫХ ПО *DYSF*

О.Н. Чернова¹, М.О. Мавликеев¹, А.К. Зейналова¹, Р.В. Деев^{2,3}, А.П. Киясов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Россия

⁴ПАО «Институт стволовых клеток человека», Москва, Россия

Почтовый адрес для корреспонденции: 420015, Казань, ул. Карла Маркса, 74

Контактный телефон: +79503123878

e-mail: olgachernova92@yandex.ru

РЕФЕРАТ

Дисферлинопатии – группа наследственных миодистрофий с мутацией в гене *DYSF*. Дисферлин – трансмембранный белок, играющий ключевую роль в репарации сарколеммы. Для изучения дисферлинопатий *in vivo* выделен ряд нокаутных животных. Одними из таких являются мыши линии *Bla/J*. В настоящей работе описаны процессы мутационного репаративного гистогенеза скелетной мышечной ткани после химического повреждения. В статье дана характеристика патогистологических изменений в ключевых фазах регенерации: повреждения, пролиферации, дифференцировки, ремоделирования.

Ключевые слова: регенерация, мышечная дистрофия, дисферлинопатии, скелетная мышечная ткань, модели повреждения, исследования *in vivo*

***DYSF* mutation in striated skeletal muscle regeneration after chemical injury**

O.N.Chernova¹, M.O. Mavlikeev¹, A.K. Zeynalova¹, R.V. Deev^{2,3}, A.P. Kiyasov¹

²Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

³Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

⁴Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russia

ABSTRACT

Dysferlinopathies – a group of muscular dystrophies with autosomal-recessive inheritance caused by mutations in *DYSF* gene. Dysferlin is a transmembrane protein responsible for reparation of sarcolemma. There is a number of knockout animal strains with dysferlinopathies, Bla/J is one of them. In this paper we present description of main pathohistological processes in skeletal muscle that take place in mice with dysferlinopathy.

Key words: regeneration, muscle dystrophy, dysferlinopathy, skeletal muscle, injury models, in vivo investigation

ВВЕДЕНИЕ

Скелетная мышечная ткань подвержена действию широкого спектра экзогенных (химические, физические, биологические) и эндогенных (мутации, аутоиммунная агрессия) повреждающих факторов. Процесс посттравматической регенерации мышечной ткани включает ряд последовательных морфологических фаз: активация миосателлитов, пролиферация миобластов, их дифференцировка и слияние с образованием миосимпласта [1]. Для каждой из перечисленных фаз характерна

экспрессия специфичных им маркеров (например, myogenin – маркер поздней миогенной дифференцировки).

Существует комплекс механизмов, направленный на поддержание целостности гомеостаза поврежденной клетки [2]. В репарации сарколеммы участвует ряд белков, одним из которых является дисферлин [3, 4]. Известно, что дисферлин с другими белками (аннексинами, митсугмином 53, кальпаином-3, АННАК, тубулином, кавеолином-3) участвует в физиологической репарации сарколеммы путем образования патча (временной «заплатки») в месте повреждения, тем самым предотвращая вход ионов кальция в клетку и выход содержимого мышечного волокна (МВ) в экстрацеллюлярное пространство. Помимо участия в везикулярном транспорте, дисферлин нужен для клеточной адгезии и хемоаттракции нейтрофилов (белок связан с экспрессией хемокинов и цитокинов). Дисферлин экспрессируют не только МВ, но и ряд других клеток, в частности, эндотелиоциты. [3-6]. Для последних описано участие белка в ангиогенезе. Таким образом, дисферлин влияет не только на репарацию сарколеммы, но и на другие процессы, происходящие в поврежденной скелетной мышечной ткани.

Мутации в гене дисферлина приводят к развитию дисферлинопатий – группе наследственных мышечных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования [7, 8]. Существует четыре клинических фенотипа дисферлинопатий: поясно-конечностная мышечная дистрофия тип 2В (ПКМД2В), дистальная миопатия Миоши, дистальная миопатия с первичным поражением передней группы мышц голени и проксимально-дистальные формы. Заболевание, как правило, манифестирует в возрасте до 20 лет с появления прогрессирующей мышечной слабости преимущественно в мышцах нижних конечностей и их постепенной атрофии. В течение следующих 15 лет большинство пациентов инвалидизируются и не способны передвигаться самостоятельно.

Гистологически обнаруживают некроз с лейкоцитарной инфильтрацией, фиброз и липоидоз [9, 10].

Для изучения наследственной патологии *in vivo* выведено множество линий нокаутных животных, одной из которых является линия мышей Vla/J с отсутствием экспрессии дисферлина. Линия была разработана путем вставки ретротранспозона в 4 интрон мышам контрольной линии – C57BL/6 [11].

Изучение процессов репарации на линейных животных необходимо для понимания патогенетических процессов заболевания, а также для разработки и тестирования генных и клеточных препаратов.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке влияния отсутствия дисферлина на репаративную регенерацию скелетной мышечной ткани после химического повреждения.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Объектом исследования стали 16 мышей линии Vla/J (экспериментальная группа) и 16 мышей линии C57BL/6 (контрольная группа), самцы в возрасте 5 месяцев. 100 мкл 0,1% раствора новокаина (производитель Renewal) вводили в медиальную головку правой икроножной мышцы всем животным. Инъекцию производили открытым способом через кожный разрез. В каждой контрольной точке (2, 4, 10 и 14 сутки) проводили эвтаназию 4 животных из каждой группы передозировкой эфирным наркозом. В качестве 0 суток исследовали интактную икроножную мышцу мышей того же возраста. Содержание и экспериментальная работа с животными соответствовала правилам, принятым в Российской Федерации, национальным законам и рекомендациям локального этического комитета [12].

Проводку фиксированных в 10% забуференном растворе образцов проводили в гистологическом процессоре Thermo SCIENTIFIC, заливали в

парафин. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори и иммуногистохимически с антителами к альфа-гладкомышечному актину (α -SMA, DAKO, клон 1A4, разведение 1:50), Ki-67 (Abcam, клон ab16667, 1:200), myogenin (DAKO, клон F5D, 1:100), тяжелым цепям быстрых и медленных миозинов (MHC fast, Sigma, клон My-32, 1:500; MHC slow, Sigma, клон NOQ7.5.4D, 1:2000). На полученном материале изучали последовательные процессы, протекающие в поврежденной мышечной ткани:

Повреждение. Долю некротизированных МВ подсчитывали во всей области повреждения по срезам, окрашенным гематоксилином и эозином.

Пролиферация оценивалась на срезах, окрашенных с антителами к Ki-67, высчитывали три показателя: 1) отношение Ki-67-позитивных ядер МВ к общему числу ядер МВ; 2) отношение Ki-67-позитивных ядер эндотелия сосудов к общему числу ядер эндотелия сосудов; 3) отношение Ki-67-позитивных ядер в интерстициальных клетках к общему числу ядер в интерстициальных клетках).

Дифференцировка. По срезам, окрашенным гематоксилином и эозином, проводили подсчет средней площади поперечного сечения мышечных волокон и доли центральоядерных МВ (ЦЯМВ), оценивали позднюю миогенную дифференцировку путем подсчета доли миогенин-позитивных ядер. Изучали соотношение волокон, экспрессирующих тяжелые цепи быстрых и медленных миозинов при ИГХ окрашивании с АТ к МНС fast/slow.

Ремоделирование и функциональная адаптация мышечной ткани. Оценивали васкуляризацию путем подсчета плотности сосудов по срезам, окрашенным иммуногистохимически с АТ к α -SMA, а также долю соединительной ткани при окрашивании по Маллори.

Окрашенные срезы фотографировали с помощью светового микроскопа Axio Imager Z2 (Zeiss, Germany), а также сканировали с помощью сканера предметных стекол Aperio CS2 (Leica Microsystems,

Germany). Полученные изображения анализировали с использованием программ Aperio ImageScope и ImageJ (NIH, USA).

Результаты морфометрического анализа выражали в виде средних величин \pm стандартное отклонение (СО). Статистическую достоверность различий средних величин двух линий мышей оценивали в программе Statistica 10.0 U-критерием Манна-Уитни для двух независимых выборок со значением $P < 0.05$ в качестве уровня значимости.

Результаты и обсуждение

Экспрессия дисферлина

С целью подтверждения отсутствия экспрессии дисферлина у мышей линии Vla/J было произведено иммунофлюоресцентное окрашивание с антителами к *DYSF* (Abcam, клон ab12468, 1:200) со вторыми этажами AlexaFluor647 в разведении 1:2000 (рис.1)

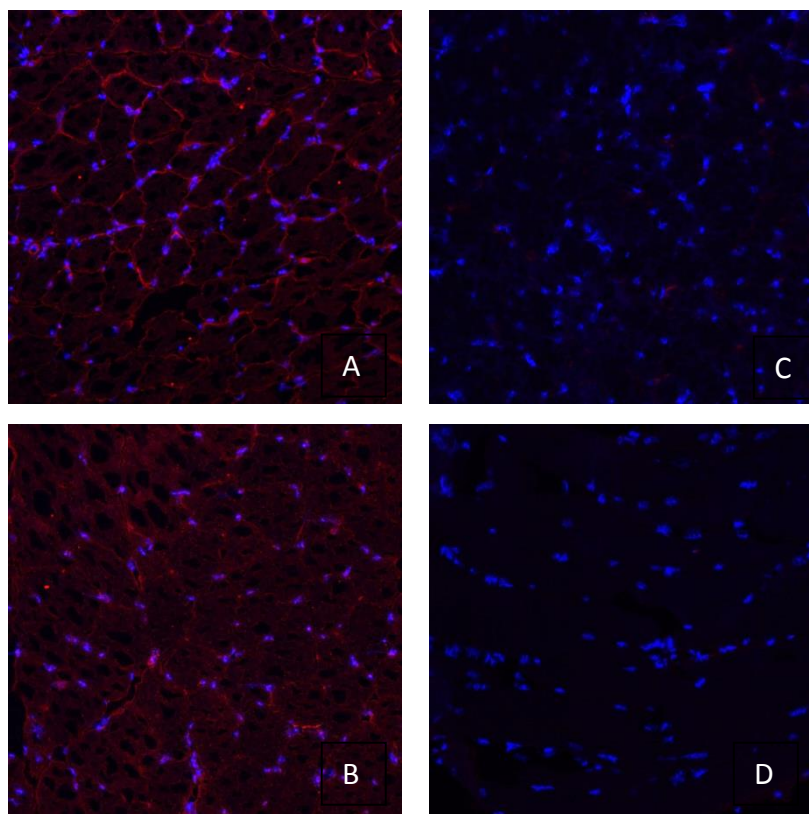


Рис.1 Срез икроножной мышцы, А – мышцы линии C57BL/6 с АТ к *DYSF*, С – то же, негативный контроль; В – мышцы линии Vla/J с АТ к *DYSF*, D – то же, негативный контроль. Иммунофлюоресцентное окрашивание, ув. x200

Альтерация. Доля некротизированных мышечных волокон является критерием восприимчивости к повреждению. Показатель у обеих групп животных был максимальным на 2 сутки ($35,1\% \pm 9,7\%$ у В1а/Ј и $29,383\% \pm 15,36\%$ у С57В1/6, $p < 0,05$, рис.2). У контрольной группы значения постепенно снижались до 14 суток ($2,5\% \pm 1,69\%$). Интересна динамика показателя у дисферлин-дефицитных мышей, у которых после снижения от 2 к 10 суткам к 14 дню показатель возрос с $5,79\% \pm 5,1\%$ до $8,7\% \pm 5,4\%$. Вероятно, большее значение показателя на 2 сутки у В1а/Ј связано с нарушением внутриклеточной регенерации в МВ и доля некроза у них изначально выше. Снижение значений к 10 суткам свидетельствует о том, что репарация сарколеммы возможна и в условиях отсутствия экспрессии дисферлина, хоть и менее интенсивна. Примечательно, что у В1а/Ј доля некроза повышается к 14 суткам, что связано со второй волной гибели МВ при отсутствии дисферлина.

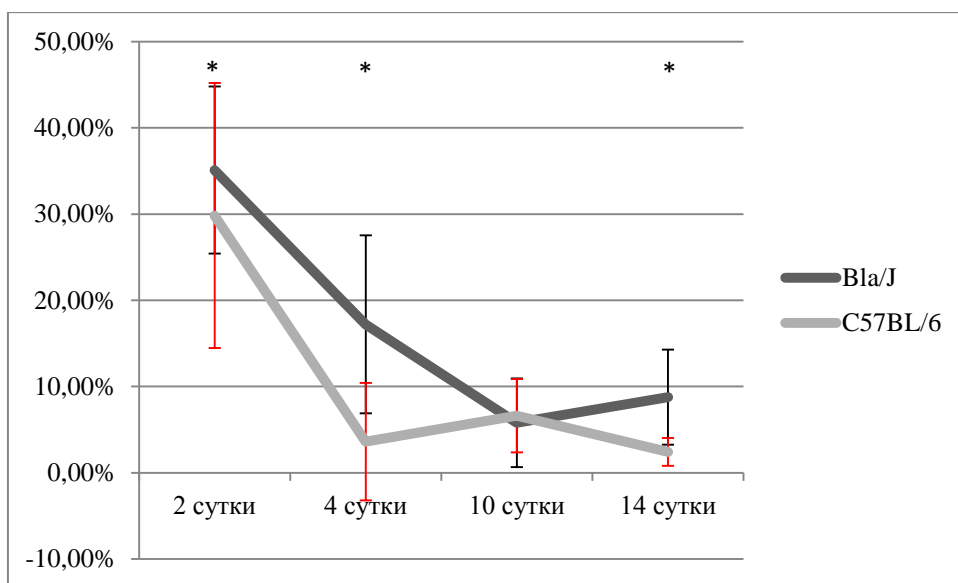


Рис 2. Динамика изменений доли некротизированных МВ у мышей линий В1а/Ј и С57В1/6 после введения новокаина, * – $p < 0,05$

Пролиферация. Пролиферативные процессы после повреждения характерны не только для мышечных волокон, но и для других элементов в составе мышцы, в частности, сосудов и интерстиция, поэтому целесообразно оценивать и их репаративную способность. Наиболее часто

используемый маркер пролиферации – Ki-67. Доля Ki-67-позитивных ядер в МВ в нашем эксперименте снижается в обеих группах от 2 до 14 суток, однако на всех сроках, кроме 10 суток, показатель выше у контрольной линии (рис.3), что свидетельствует о сниженной пролиферативной активности в отсутствие дисферлина. К 14 суткам показатель у обеих групп не превышает 1%, таким образом, пролиферация у обеих линий завершается к концу 2й недели после травмы.

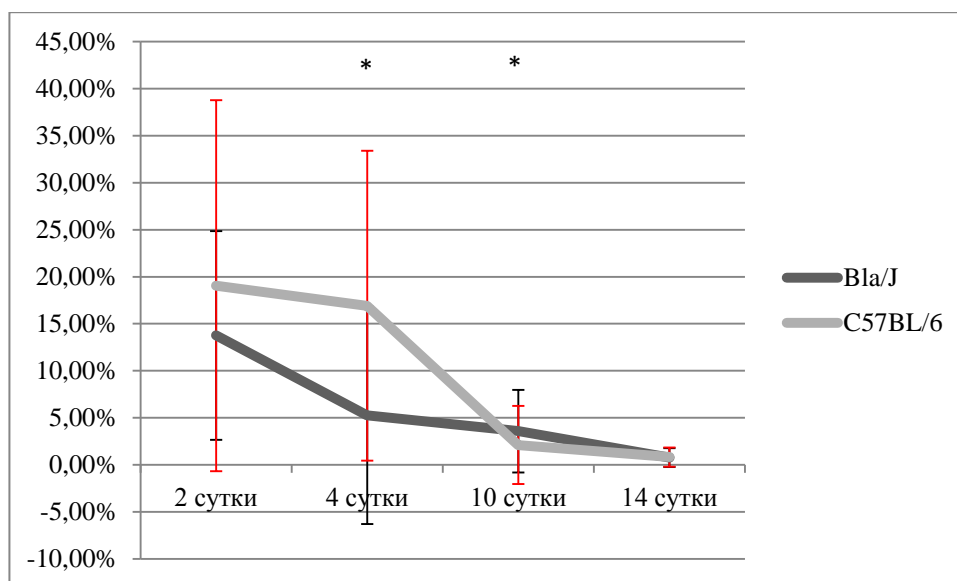


Рис 3. Динамика снижения доли Ki-67-позитивных ядер в МВ после введения новокаина, * – $p < 0,05$

Динамика показателя пролиферации в интерстиции равна таковой в МВ: он снижается быстрее у Bla/J между 2 и 4 сутками (примерно на 8-9%, для сравнения у контроля – лишь на 3-4%), а у C57BL/6 снижение происходит между 4 и 10 (приблизительно на 14%, у Bla/J \approx 0-2%). Данное наблюдение свидетельствует о менее интенсивном и более позднем завершении пролиферации у Bla/J.

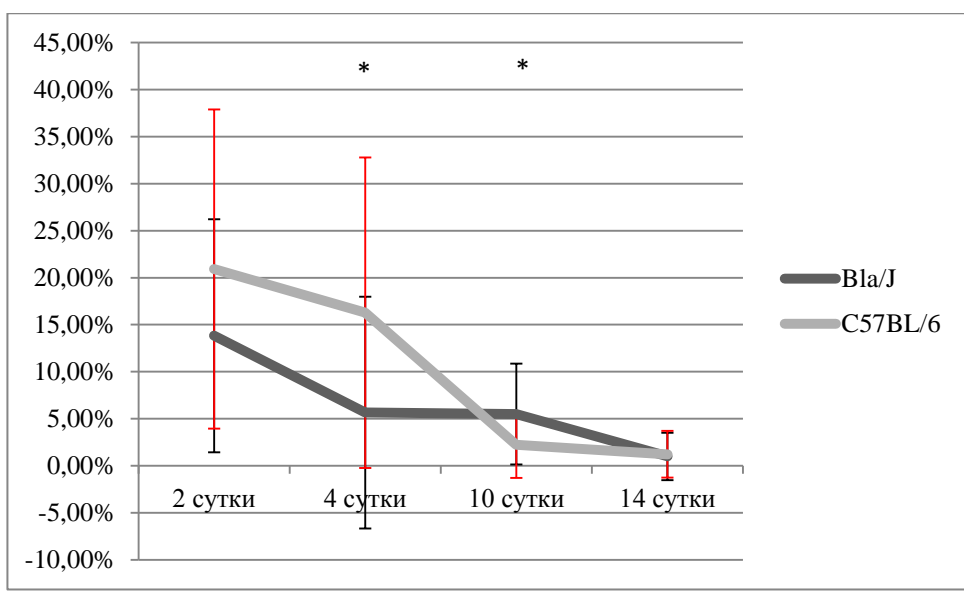


Рис 4. Доля Ki-67 -позитивных ядер в интерстиции, * – $p < 0,05$

Пролиферация эндотелия сосудов заслуживает отдельного внимания. Однако показатель ниже у последних с 4 по 14 сутки, что снова подтверждает гипотезу о снижении пролиферативной активности в отсутствие дисферлина (рис.5). Если у контрольной группы прирост показателя со 2 к 4 суткам меняется с $16,05 \pm 16,7\%$ до $26,86 \pm 13,69\%$, то у экспериментальной лишь с $16,56 \pm 11,67\%$ до $16,67 \pm 7,32\%$. Следовательно, пролиферативная активность после предшествующей травмы у Bla/J недостаточна. Это может быть связано с отсутствием дисферлина в эндотелиоцитах, где доказано его участие в ангиогенезе [13]. После спада показателя к 10 суткам к 14 он снова возрастает и составляет $19,9 \pm 7,83\%$ у контроля (максимальный показатель).

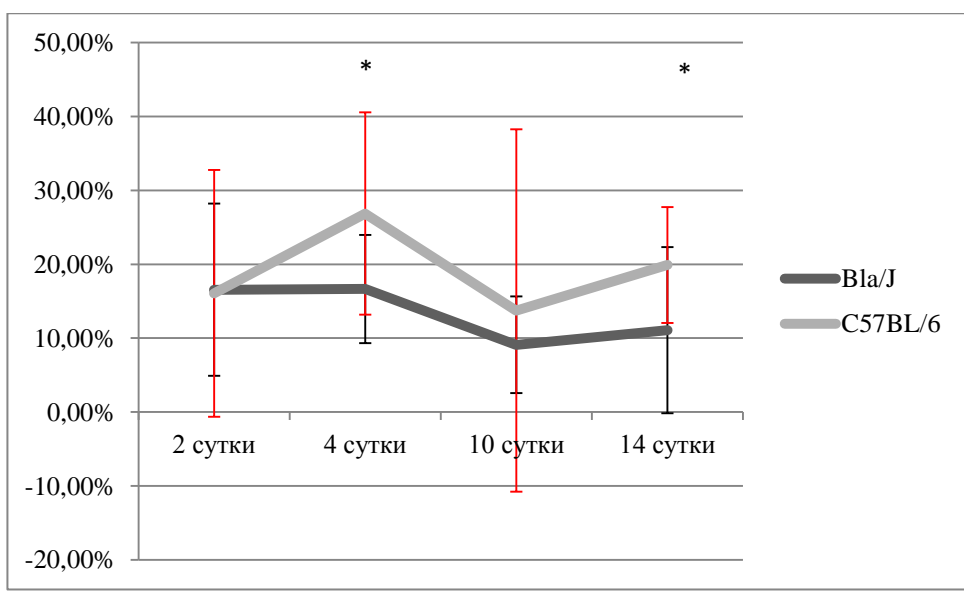


Рис 5. Доля Ki-67-позитивных ядер в эндотелии сосудов, * – $p < 0,05$

Дифференцировка. Позднюю миогенную дифференцировку как показатель успешности регенерации оценивали по доли миогенин-позитивных ядер. Максимум у обеих линий наблюдается 4 сутки, постепенное снижение к 10. Показатели у C57BL/6 выше на всех точках. Таким образом, поздняя миогенная дифференцировка после введения новокаина в условиях дефицита дисферлина имеет место быть, однако доля миогенин-позитивных ядер ниже на всех сроках. Вероятно, имеется обратная зависимость между числом дифференцированных ядер и долей некроза у мутантных животных. Нельзя исключать, что у Bla/J мышей регенеративный потенциал может быть априори снижен вследствие того, что в их онтогенезе и так непрерывно происходит репарация поврежденных волокон. Миогенная дифференцировка активируется, но она не завершена.

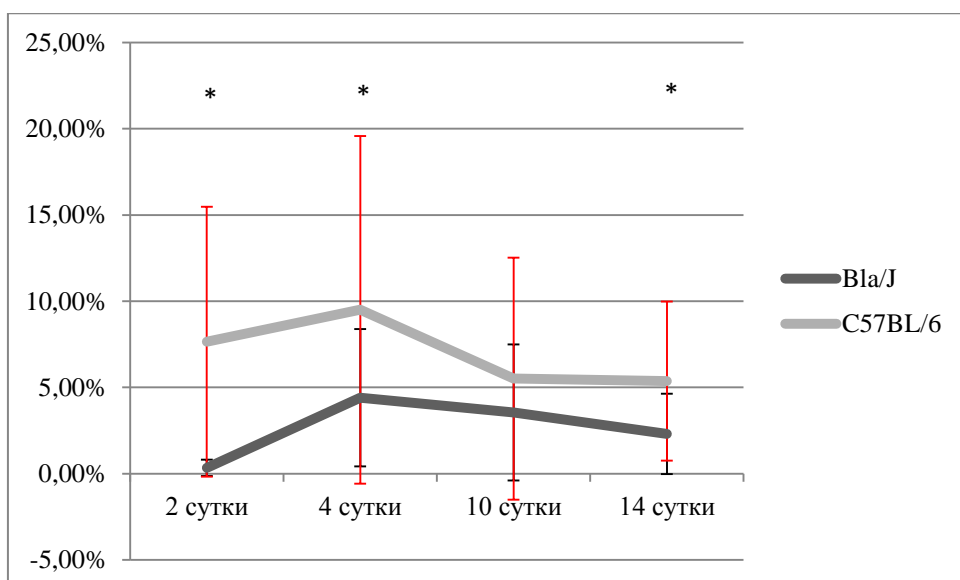


Рис.6. Динамика изменений доли миогенин-позитивных ядер у мышечных линий C57BL/6 и Bla/J в ответ на введение новокаина, * – $p < 0,05$

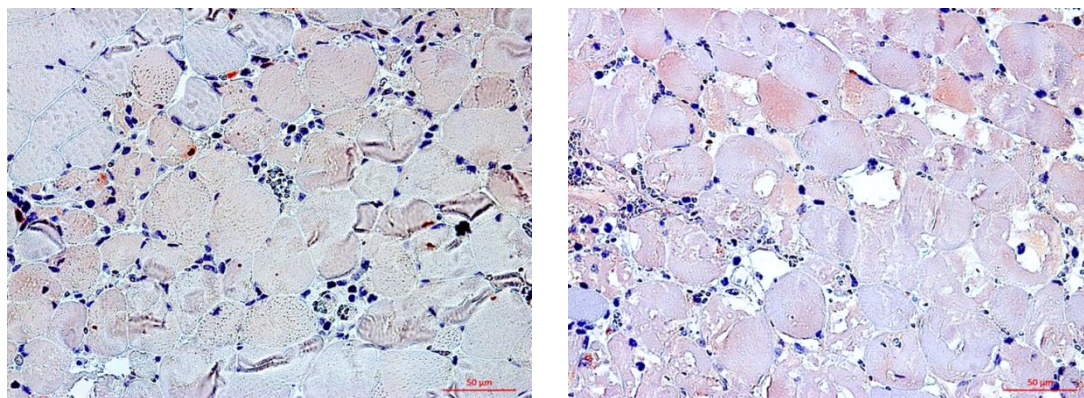


Рис 7. 2 сутки после химической травмы, слева – икроножная мышца мыши C57BL/6, справа – Bla/J. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к myogenin, ув. x400

ЦЯМВ отражают процессы регенерации МВ, когда ядра с периферии волокна смещаются к центру [ссылка]. Данный показатель был минимальным для обеих групп на 2 сутки, у мышечной линии Bla/J был ниже по сравнению с контролем до 10 суток включительно, что свидетельствует о более позднем начале репаративных процессов в условиях отсутствия дисферлина (рис.8). К 14 суткам у контроля показатель впервые идет на спад, что говорит о завершении дифференцировки, в то время как для экспериментальной группы в данной точке наблюдается максимальное значение показателя ($43,5\% \pm 3,7\%$ у Bla/J и $39,2\% \pm 4,1\%$ у C57BL/6, $p =$

0,45). Таким образом, у *Bla/J* наблюдается тенденция к дифференцировке во всех экспериментальных точках.

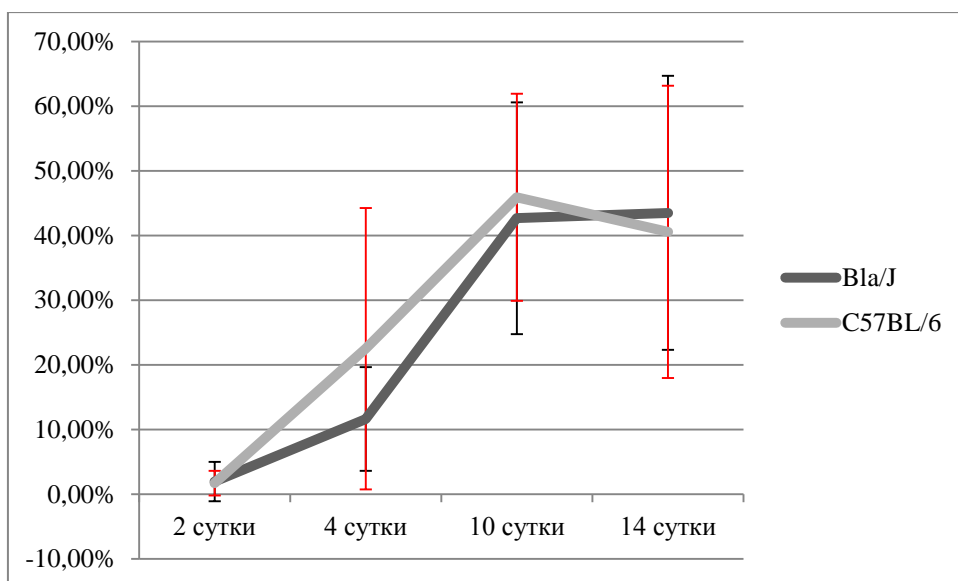


Рис 8. Динамика изменений доли ЦЯМВ после травмы

Другим показателем, отражающим рост МВ, является средняя площадь поперечного сечения МВ. Данный параметр на всех сроках был выше у мышей *Bla/J* (рис.9), что можно расценить как компенсаторную гипертрофию МВ на фоне постоянно гибнущих волокон. У контрольной линии величина падает к 4 суткам и составляет $503,63 \pm 548,47 \text{ мкм}^2$, что связано с появлением миобластов (рис.10).

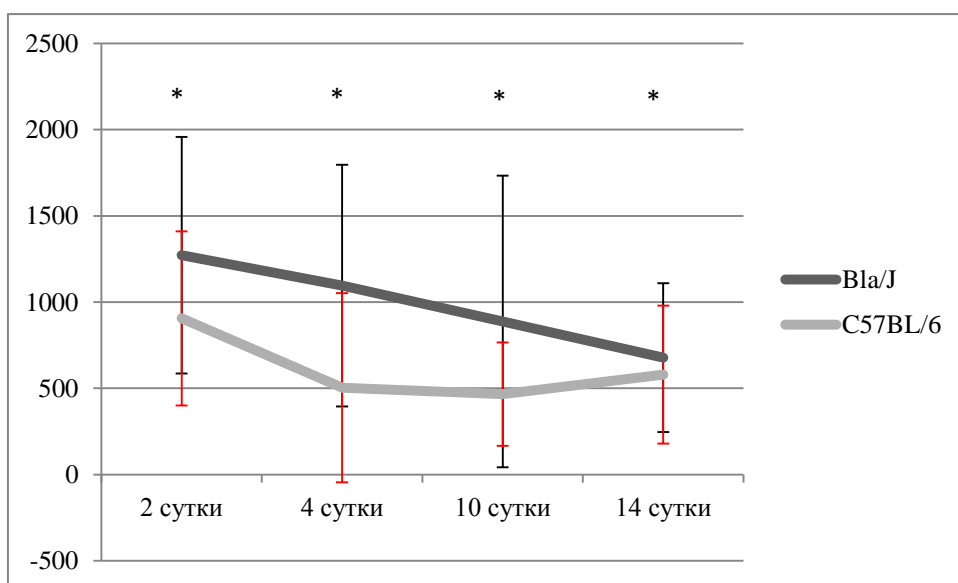


Рис.9 Средняя площадь поперечного сечения МВ, мкм^2 * – $p < 0,05$

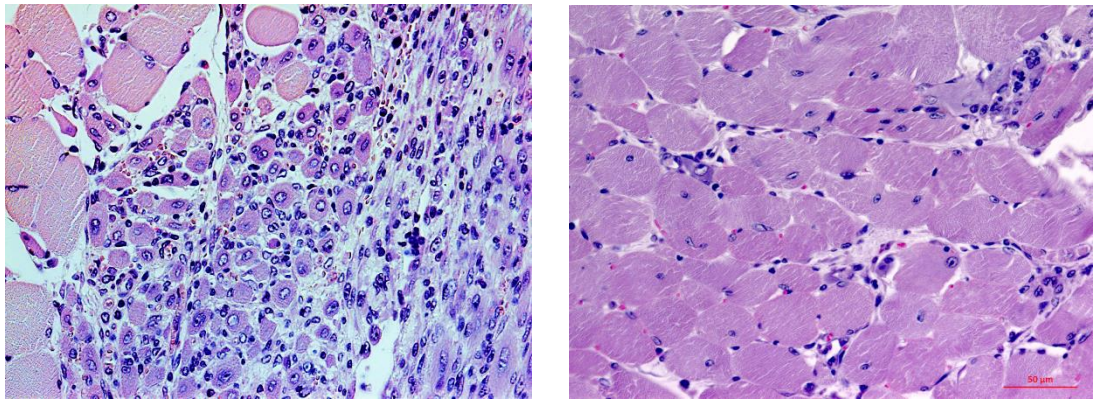


Рис.10 4 сутки после химической травмы, слева – икроножная мышца мыши C57BL/6, справа – Bla/J. Гематоксилин и эозин, ув. x400

Известно, что волокна, экспрессирующие тяжелые цепи быстрых миозинов, больше склонны к повреждению [механизм, ссылка]. У Bla/J величина соотношения МНС slow/fast выше на всех сроках. По-видимому, это связано со снижением числа волокон, экспрессирующих МНС fast после травмы.

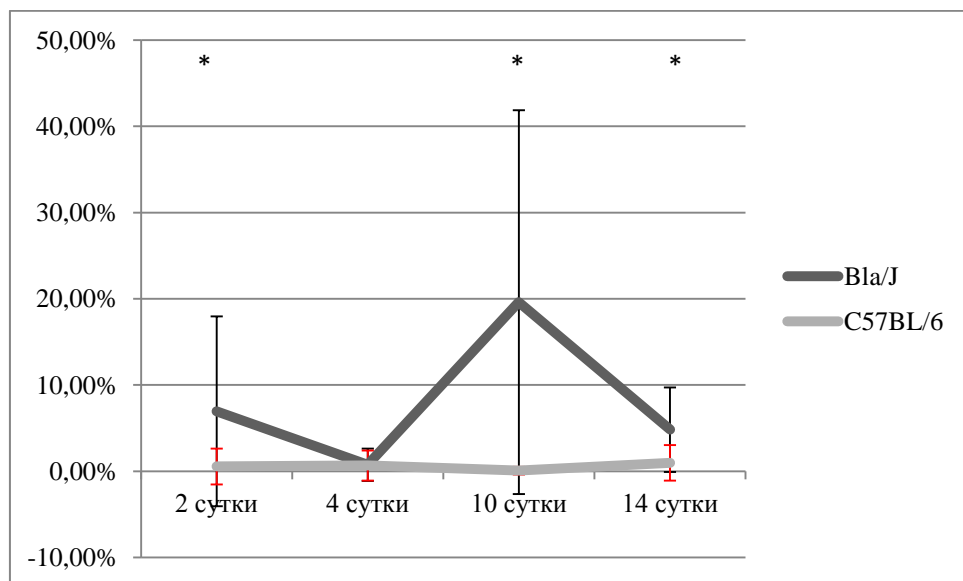


Рис.11. Соотношение волокон, экспрессирующих тяжелые цепи медленных и быстрых миозинов, * – $p < 0,05$

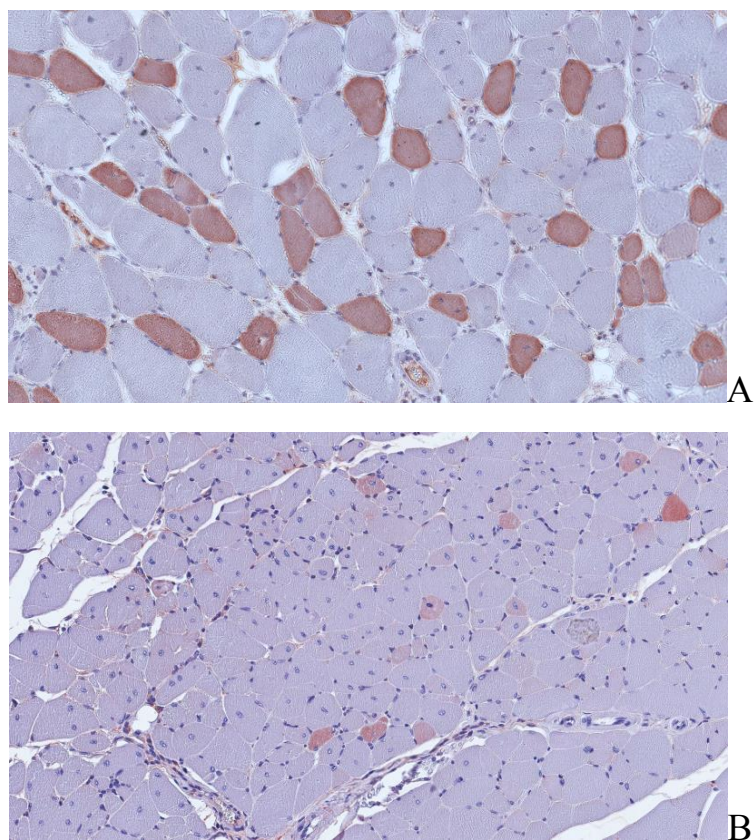


Рис.12 10 суток после химической травмы, А – икроножная мышца мыши Bla/J, В – C57BL/6. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к МНС slow, ув. x200

Ремоделирование и функциональная адаптация мышечной ткани – завершающий этап в восстановлении морфофункциональной способности поврежденной ткани, который находит отражение в фиброзировании и васкуляризации.

Сосудистая плотность повышается со 2х суток эксперимента в обеих группах и достигает своего максимума к 14 дню ($22,65 \pm 7,19\%$ у контроля и $20,85 \pm 7,15\%$ у Bla/J, рис.9). Отставание показателей у последних, вероятно, связано со сниженной экспрессией дисферлина в эндотелиоцитах.

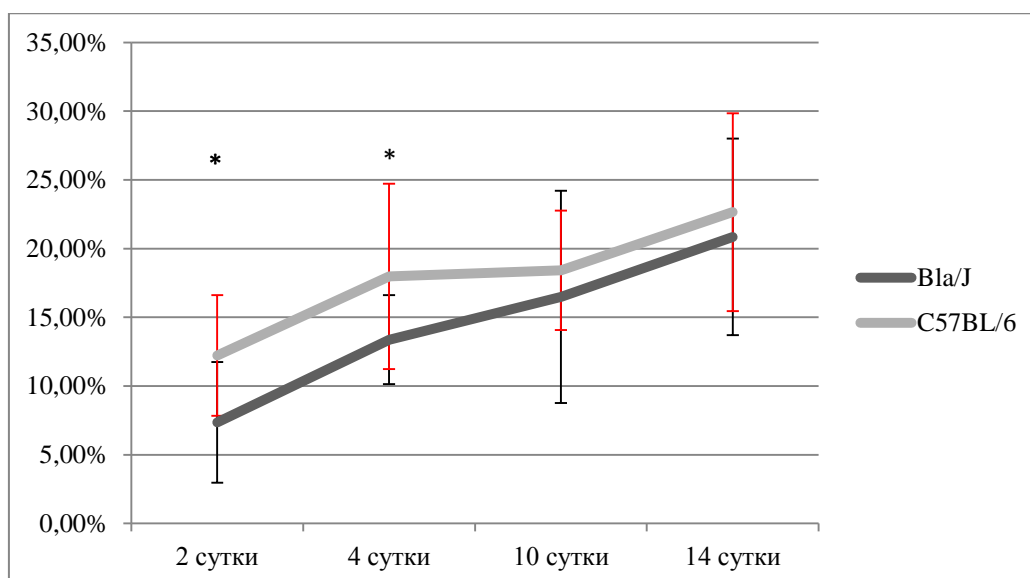


Рис.13. Сосудистая плотность в икроножной мышце после введения новокаина, * – $p < 0,05$

Различия в доле соединительной ткани (СТ) хоть и статистически достоверны на всех сроках, однако не существенны и едва превышают 0,3% у мышей Bla/J (максимум $0,34 \pm 0,46\%$ на 14 сутки), что наблюдается и на 0 сутках и позволяет предположить, что доля СТ не связана с влиянием новокаина.

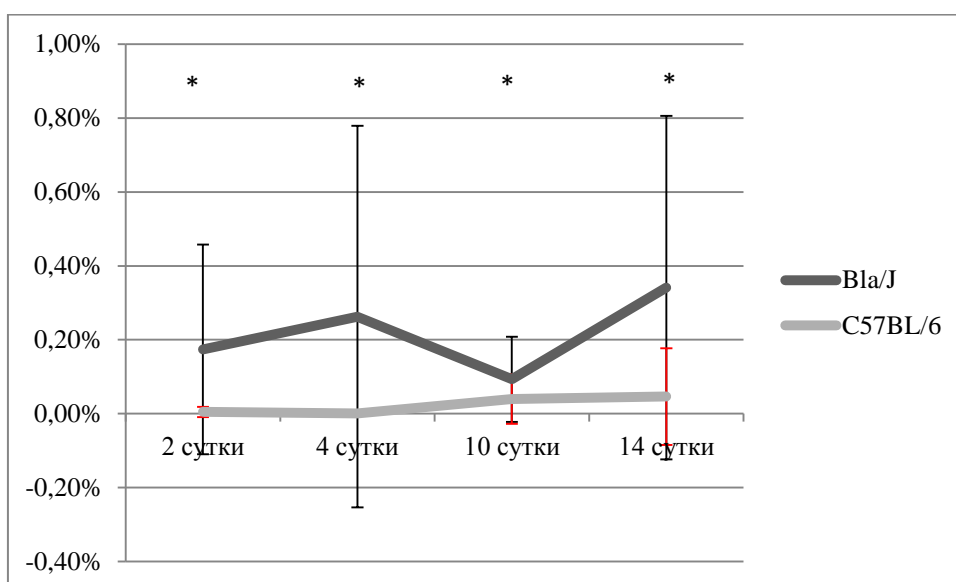


Рис.14 Доля соединительной ткани, * – $p < 0,05$

Заключение

Понимание процессов регенерации скелетной мышечной ткани при наследственной мышечной патологии крайне важно как с точки зрения изучения патогенеза, так и для разработки таргетной терапии. В данной работе впервые описано влияние миотоксичного агента на мышечную ткань в условиях дефицита дисферлина, дано патогистологическое заключение ключевым стадиям восстановления мышцы.

Результаты описанной исследовательской работы показывают, что репарация в условиях отсутствия дисферлина претерпевает те же стадии, что и в нормальной мышечной ткани, однако с некоторыми отличиями: альтерация протекает интенсивнее с большей долей некроза, процессы восстановления замедленны, пролиферативная активность снижена, дифференцировка отсроченная и не завершенная, степень ремоделирования ниже.

Литература:

- 1) Руководство по гистологии под редакцией Р.К, Данилова, том 1. СпецЛит, СПб, 2011. С 440
- 2) Патологическая анатомия : учебник / А. И. Струков, В. В. Серов. - 5-е изд., стер. - М.: Литтерра, 2010. - 848 с. : ил.
- 3) Campbell, C.P. Dysferlin and muscle membrane repair / C.P. Campbell, R. Han // *Curr Opin Cell Biol.* – 2007. – 19(4). – P. 409-16.
- 4) Cooper, S.T. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology / S.T. Cooper, P.L. McNeil // *Physiol Rev.* – 2015. – 95(4). – P. 1205-40.
- 5) Huang Y. АННАК, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration / Y. Huang, S.H. Laval, A. van Remoortere, J. Baudier, C. Benaud, L.V. Anderson, V. Straub, A. Deelder, R.R. Frants, J.T. den Dunnen, K. Bushby, S.M. van der Maarel // *FASEB* – 2007. – J. 21. – P.732–742
- 6) Huang Y. Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle / Y. Huang, A. de Morree, A. van Remoortere, K. Bushby, R.R. Frants, J.T. den Dunnen, S.M. van der Maarel // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – 17. – P.1855–1866.
- 7) Bushby, K.M. Dysferlin and muscular dystrophy / K.M. Bushby // *Acta Neurol Belg.* – 2000. – 100(3). – P. 142-5.
- 8) Liu J. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy / J. Liu, M. Aoki, I. Illa, et al. // *Nat Genet.* – 1998. – 20. – P.31–36.
- 9) Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview. Pegoraro E1, Hoffman EP2. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2000 Jun 8 [updated 2012 Aug 30].
- 10) Aoki M. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy / Aoki M., Liu J., Richard I. et al. // *Neurology.* – 2001. – 57. – P.271–278.
- 11) <https://www.jain-foundation.org/scientific-resources/research-tools/mouse-models-dysferlin-deficiency/mouse-models-blaj>

12) Генин А.М., Капланский А.С. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. Авиакосмическая и экологическая медицина 2001; 4: 14-20.

13) Sharma A. A new role for muscle repair protein Dysferlin in Endothelial Cell Adhesion and Angiogenesis -R2 / A. Sharma, C. Yu, C. Leung et al. // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2010. – 30(11). – P.2196-2204.