

УДК 611/612

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Серда Е.В., Балицкий С.Е., Юнси Г.А.

Аннотация. В статье представлены данные литературы о морфологических аспектах регенерации скелетных мышц. При повреждении скелетные мышцы подвергаются снижению функциональной активности, что является препятствующим фактором для выполнения той или иной мышечной активности. В работе представлены возможные варианты, которые могут уменьшить повреждение мышечного волокна. Известно, что скелетные мышцы. Скелетная мышца является симпластом, многоядерной структурой, которая образуется в онтогенезе вследствие слияния миобластов. Миоядра, или собственные ядра мышечного волокна, располагаются на периферии и в пространстве, которое находится между миофибриллами и сарколеммой. Также мышечное волокно содержит ядра, которые принадлежат фибробластам, эндотелиоцитам и миосателлитам. Скелетная мышечная ткань способна к регенерации после повреждения. Однако при большой потере мышечной массы для регенерации потребуются интервенционная поддержка. Следовательно, повреждение скелетной мышечной ткани является весомой проблемой в клинике. Для содействия восстановлению и регенерации мышц в течение последнего столетия и особенно в течение последних нескольких десятилетий были разработаны различные способы, в их числе хирургические методы, физиотерапия, использование биоматериалов, мышечная тканевая инженерия, а также клеточная терапия. Тем не менее, существует большая потребность в разработке новых методов и материалов, которые помогут восстановлению скелетных мышц и их функциональной регенерации.

Ключевые слова: скелетные мышцы, регенерация, повреждение, скаффолды, тканевая инженерия, клеточная терапия.

Abstract. The article presents the literature data about the morphological aspects of skeletal muscle regeneration. In case of damage, skeletal muscles are subjected to a decrease in functional activity, which is an obstacle to the performance of a particular muscle activity. The article presents possible options that can reduce muscle fiber damage. Skeletal muscle is simplast, multi-core structure, which is formed in ontogenesis as a result of the merger of myoblasts. Myonuclei, or their own muscle fiber nuclei, are located on the periphery and in the space that lies between the myofibrils and the sarcolemma. Also muscle fiber contains nuclei, which belong to fibroblasts, endothelial cells and myosatellites. Skeletal muscle tissue is able to regenerate after damage. However, with a large loss of muscle mass, regeneration will require interventional support. Consequently, damage of skeletal muscle tissue is a significant problem in the clinic. Various techniques have been developed to promote muscle recovery and regeneration over the last century and especially over the past few decades, including surgical techniques, physiotherapy, biomaterial use, muscle tissue engineering, and cell therapy. However, there is a great need to develop new methods and materials that will help restore skeletal muscles and their functional regeneration.

Key words: skeletal muscles, regeneration, damage, scaffolds, tissue engineering, cell therapy.

Введение. Скелетная мышечная ткань является одной из самых распространённых в организме человека. На её долю приходится до 40-45% от общей массы тела. Существует порог регенерационного процесса скелетной мышцы, после превышения которого мышечная ткань теряет способность к восстановлению своих функций. Потеря скелетной мышечной ткани с длительным функциональным ухудшением определяется как «значительная потеря мышечной ткани» (VML - volumetric muscle loss), что может существенно повлиять на качество жизни человека, значительно снизив функциональность опорно-двигательного аппарата. Целью данной работы является анализ литературных источников с проведенными ранее исследованиями по восстановлению и регенерации тканей скелетных мышц.

Частыми причинами травм скелетных мышц являются дорожно-транспортные происшествия, травмы, полученные при взрывах, боевые ранения, хирургические и ортопедические манипуляции (например, после синдрома длительного сдавливания или резекции опухоли) или повреждения, случившиеся в ходе занятий спортом, приводящие к острой потере мышечной ткани. Повреждения, превышающие 20% мышечной массы, нуждаются в реконструктивных хирургических вмешательствах. Прогрессирующая

мышечная потеря может быть следствием метаболических нарушений или наследственных генетических заболеваний, таких как мышечная дистрофия Дюшена, латеральный амиотрофический склероз и детская болезнь Шарко-Мари-Тута [10]. Атрофия мышц также может быть следствием травм периферических нервов, хронической болезни почек, сахарного диабета и сердечной недостаточности [3]. Потеря мышечной массы до 20% может быть компенсирована высокой адаптивностью и регенеративным потенциалом скелетных мышц. За этим порогом функциональные нарушения неизбежны и могут привести как к тяжелой инвалидности, так и к косметическим деформациям, поэтому терапевтическое вмешательство крайне востребовано для таких пациентов.

Анализ и обсуждение. Мышечная регенерация зависит от гетерогенной популяции сателлитных клеток, интерстициальных клеток и кровеносных сосудов и в основном контролируется с помощью белков межклеточного матрикса и секретируемых факторов [4]. В норме мышечная масса поддерживается балансом между синтезом и катаболизмом белка. В большинстве случаев VML тормозит регенерационную способность скелетных мышц, поскольку физически удаляются необходимые регенеративные элементы, в основном сателлитные клетки, периваскулярные стволовые клетки и базальная мембрана. Через денервацию активируются сигнальные пути распада белков (протеасомальные и аутофагиально-лизосомальные пути). Поэтому скорость разложения белка превышает его синтез, что способствует атрофии мышц, сопровождающейся постепенным снижением мышечной массы и диаметров мышечных волокон. Реваскуляризация обычно нарушается. Вследствие наступают ишемические условия способствующие пролиферации фибробластов, фиброзу и формированию фиброзной рубцовой ткани, что приводит к дальнейшей дистрофии мышцы. Состав и степень белков межклеточного матрикса в рубцовых тканях влияют на многие аспекты миогенеза, функции мышц и реиннервации. При хронической потере мышечной массы, такой как мышечная дистрофия Дюшена, фиброз является серьезной проблемой. Вследствие того, что последовательное разрушение миофибрилл не может быть полностью компенсировано пролиферацией сателлитных клеток, следующие воспалительные процессы приводят к изменению продукции белков внеклеточного матрикса и последующему развитию фиброза, а также формированию рубцовой ткани. Рубцовое образование можно уменьшить либо путем введения, например, 5-фторурацила и блеомицина, которые противодействуют пролиферации фибробластов и неоангиогенезу, либо с помощью лазерной терапии и функциональными улучшениями через 6-12 месяцев лечения [1]. Регенерация с регрессией рубцовой ткани и функциональным восстановлением может быть также оптимизирована с помощью трансплантации жира. Тем не менее, уменьшение фиброобразования недостаточно для восстановления и регенерации мышечного волокна.

Клинические и научные исследования способствуют восстановлению большой мышечной потери. Современный стандарт лечения VML, как правило, основан на хирургическом вмешательстве с аутологичным мышечным трансплантатом и физиотерапией. Другими способами, которые применяют в клинике, являются: иглоукалывание и применение скаффолдов.

Хирургическое лечение VML включает в себя в основном санацию рубцовой ткани и / или транспозицию мышц. Аутологичная пересадка мышц обычно выполняется в клинической ситуации, когда после травмы, резекции опухоли или повреждения нерва возникают большие участки мышечной потери, что значительно ухудшает двигательную функцию. Хирурги трансплантируют здоровую мышцу из донорского участка, не затронутого повреждением, для восстановления утраченной или нарушенной функции. При отсутствии прилегающей мышцы из-за высокого уровня повреждений нерва или тяжелой травмы может быть применена аутологичная трансплантация мышцы в виде свободной функциональной пересадки. Часто используемыми аутологичными мышцами являются *m. latissimus dorsi* и *m. gracilis*. Было показано, что пересадка *m. latissimus dorsi* является безопасной и эффективной для восстановления сгибания локтевого сустава [8]. В случае синовиальной саркомы, поражающей *m. gluteus medius* и *m. gluteus minimus*, функция пораженного тазобедренного сустава может быть полностью восстановлена с помощью свободной нейроваскулярной трансплантации *m. latissimus dorsi*. Трансплантация *m. gracilis* обычно используется для восстановления локтевого сустава после травмы плечевого сплетения. Хотя данные мышечные лоскуты могут приводить к значительным терапевтическим результатам, они вызывают прогрессирующую заболеваемость донорского участка и недостаточность иннервации. Более того, до 10% этих реконструктивных операций приводят к полному отторжению трансплантата из-за таких осложнений, как инфекция и некроз.

Физические упражнения обладают способностью предотвращать снижение массы скелетных мышц. Таким образом, помимо хирургических методов, физиотерапия - это неинвазивный / минимально инвазивный способ улучшения восстановления и регенерации мышечной ткани. Данный метод получил широкое применение при восстановлении после травм и трансплантации мышечной ткани или для лечения хронической мышечной дистрофии. Физическая реабилитация направлена на укрепление сохранившихся мышц. Показано, что физиотерапия ускоряет заживление/регенерацию мышц, модулируя иммунный ответ, высвобождая факторы роста, способствуя васкуляризации и уменьшая образование рубцов. Физические упражнения и массаж, стимулирующие ангиогенез, являются потенциальными способами, ускоряющими образование новой мышечной ткани в клинически пересаженных мышечных трансплантатах или других хирургических операциях. Сообщалось,

что физические тренировки могут регулировать сигнальный путь IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) и уменьшать миостатин в мышечной ткани животных и людей, тем самым предотвращая атрофию мышц. Физическая терапия действительно может улучшить восстановление мышц; однако этот метод не приносит весомых результатов при регенерации мышц у больных с VML. Кроме того, пациенты с тяжелыми заболеваниями или травмами часто не могут проводить последовательные упражнения, что ограничивает физическую терапию как лечение VML.

Акупунктура - это отрасль традиционной китайской медицины, которая широко используется для лечения различных заболеваний по всему миру. Было показано, что лечение электрическим иглоукалыванием подавляет экспрессию миостатина, приводя к пролиферации клеток-сателлитов и восстановлению скелетных мышц. Акупунктура + низкочастотная электрическая стимуляция (Асу-LFES - Acupuncture plus low-frequency electrical stimulation) усиливают регенерацию мышц и предотвращают потерю мышечной массы путем регулярных тренировок через стимуляцию сокращений. Такой метод лечения подходит для пациентов с тяжелыми заболеваниями, которые не могут часто выполнять упражнения. Было показано, что Асу-LFES противодействует атрофии скелетных мышц, вызванной диабетом, путем увеличения IGF-1 и тем самым стимулирует регенерацию мышц. Применение Асу-LFES для лечения диабетической миопатии и мышечной потери, вызванной хроническим заболеванием почек, показало хорошее функциональное восстановление мышц [9]. Основным механизмом включает активацию макрофагов M2 и изменение уровней экспрессии мРНК E3 убиквитин-лигазы-атрогин-1. Подобно физическим упражнениям, иглоукалывание способствует восстановлению функции мышц и стимулирует их регенерацию, особенно у пациентов с атрофией мышц после хронических заболеваний. Тем не менее, не наблюдается значительного успеха при регенерации объемных мышечных дефектов после травмы или резекции опухоли. Кроме того, необходимо много времени, чтобы определить оптимальную продолжительность и интенсивность Асу-LFES в качестве стандартного лечения атрофии мышц.

Биологические скаффолды, состоящие из белков внеклеточного матрикса (ECM - the extracellular matrix), широко используются в регенеративной медицине и в хирургических процедурах для восстановления и регенерации тканей. Скаффолды могут способствовать восстановлению VML, обеспечивая структурную и биохимическую основу. Несколько тканевых скаффолдов были протестированы на животных моделях при незначительных потерях мышечной массы, впоследствии дали хороший результат и были апробированы в клинике. Ксеногенный внеклеточный матрикс и аутологичная ткань были использованы для восстановления функций мышц и одновременного формирования биологической ниши для регенерации. Многослойный каркас из белков межклеточного матрикса, полученный из

подслизистой оболочки свиньи, был применен для восстановления у пациентов *m. vastus medialis*. Через 4 месяца после операции наблюдался заметный прирост показателей функциональной активности, а на месте имплантации была обнаружена новая мышечная ткань. Подслизистая оболочка тонкого кишечника свиньи также использовалась для лечения дефектов брюшной стенки [6]. Кроме того, белки межклеточного матрикса свиньи из мочевого пузыря были имплантированы в попытке лечения VML у человека. Функциональное улучшение с формированием мышечной ткани наблюдалось у трех из пяти пациентов в данном исследовании. Однако ксеногенные скаффолды все еще могут вызывать неблагоприятный иммунный ответ после децеллюляризации, и могут повысить риск передачи инфекционных заболеваний. Поэтому существует клиническая необходимость в разработке новых методов, которые смогут более эффективно восстановить поврежденную мышечную ткань.

Для решения оставшихся клинических проблем и изучения новых методов восстановления скелетной мышечной ткани и её регенерации были вовлечены новейшие технологии. В то время как подходы биоинженерии тканей направлены на создание сложных мышечных структур *in vitro* для последующей имплантации и замены отсутствующих мышц, подходы тканевой инженерии развивают тканеподобные скаффолды, которые могут быть имплантированы для восстановления нового мышечного волокна из оставшейся ткани *in vivo*. Оба подхода используют комбинации скаффолдов, клеток и сигнальных путей с различным фокусом. Биологические скаффолды используются в различных клинических исследованиях в области тканевой инженерии и в течение последнего десятилетия часто изучались в доклинических моделях повреждения скелетных мышц. Они в основном изготовлены из натуральных, синтетических полимеров или белков межклеточного матрикса и направлены на создание ниши микроокружения для контроля свойств резидентных клеток. Природные полимеры, такие как альгинат, коллаген и фибрин, широко используются в инженерии скелетных мышц [2]. Они обладают собственными биоактивными сигнальными путями, которые улучшают свойства клеток. Было обнаружено, что альгинатные гели с жесткостью 13-45 кПа максимизируют пролиферацию и дифференцировку миобластов. Коллаген также может транспортировать необходимые факторы роста для увеличения миграции мышечных клеток к месту повреждения. Сообщалось, что фибрин способствует выживанию миобластов и их дифференцировке в мышечные волокна при интегрировании в ткани. Поскольку природный полимер обладает ограниченной механической жесткостью и может быть легко разрушен, для регенерации скелетных мышц используются различные синтетические материалы, такие как PGA (polyglycolic acid), PLA (polylactic acid) и PLGA (polylactic-co-glycolic acid). Синтетические полимеры можно легко направить на высвобождения факторов

роста, индуцирующих регенерацию мышц. Основные недостатки включают, как правило, более низкую клеточную аффинность по сравнению с природными полимерами и риск развития реакции иммунного ответа на полимер или продуктов его распада. Сcafфолды, полученные из белков внеклеточного матрикса, могут временно заполнить дефект и восстановить морфологию поврежденного участка. После имплантации этот участок заполняется мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) костного мозга. В результате “новый” матрикс обогащается кровеносными сосудами и восстанавливает мышечные волокна лучше, чем “обычный” внеклеточный матрикс. Действительно, показано, что гидрогели, полученные из децеллюляризованного матрикса скелетных мышц, усиливают пролиферацию скелетных миобластов при введении в ишемизированную конечность крысы. Альтернативным методом может быть использование измельченной ткани скелетных мышц, которая не была децеллюляризована, что, как сообщается, показывает лучшую регенерацию мышц, чем девитализированные скаффолды. Новообразованные мышечные клетки показали лучшую адгезию к 3D пористым скаффолдам на основе полиуретана с низкой жесткостью и большими значениями шероховатости [5]. Регенерация мышечных волокон осуществляется клетками, среди которых выделяют следующие типы, используемых для лечения VML: миобласты, сателлитные клетки (СК), мезоангиобласты, перициты и мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Наиболее хорошо изученной мышечной стволовой клеткой является сателлитная клетка (СК). СК отводится важная роль в формировании новых мышечных волокон. СК, пересаженные в мышь с мышечной дистрофией, дали высокоэффективную регенерацию поврежденного участка мышцы и улучшили её сократительную функцию. К сожалению, экспансия СК *in vitro* приводит к значительному снижению их способности продуцировать миофибриллы *in vivo* и, следовательно, получение достаточно большого количества свежих СК для клинического применения нецелесообразно. Миобласты использовались для восстановления дефектов мышечной ткани с помощью различных скаффолдов. Показано, что они функционально интегрируются в существующую мышечную ткань хозяина. Введение большего количества миобластов в мышцы показало перспективные результаты для лечения мышечной дистрофии. МСК могут быть вовлечены в формирование мышечных трубочек через слияние гетеротипических клеток после активации миогена. Мезоангиобласты и перициты так же применялись для лечения мышечной дистрофии, что привело к увеличению силы мышцы. Они также использовались в тканевых гидрогелевых носителях, причем некоторые достигли успешных результатов в развитии мышечной регенерации. Лечение с применением стволовых клеток обеспечивает заметные терапевтические преимущества при реверсивной мышечной атрофии и способствуют регенерации мышц. Терапия стволовыми клетками (например, трансплантация стволовых

клеток пуповинной крови) показала положительные результаты при лечении мышечной дистрофии Дюшена. Помимо сигнальных путей от белков межклеточного матрикса, разнообразные стимулирующие и ингибирующие факторы роста, такие как IGF-1 и TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), могут стимулировать эндогенную регенерацию скелетных мышц путем активации и/или рекрутирования стволовых клеток хозяина. Показано, что длительное воздействие факторов VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-1 или SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1) усиливает миогенез и способствует ангиогенезу и формированию мышц [7]. Быстрое высвобождение фактора роста гепатоцитов (HGF - hepatocyte growth factor), нагруженного фибриновыми микронитями, способствовало ремоделированию функциональной мышечной ткани и усилению регенерации скелетных мышц в моделях мышечной дистрофии. Хирургическое лечение гидрогелями h-ADSCs (human adipose-derived stem cells) и bFGF (basic fibroblast growth factor) приводило к функциональному восстановлению, ревазуляризации и реиннервации в разорванных мышцах с минимальным фиброзом. Кроме того, пептид PEDF (pigment epithelium-derived factor), как сообщается, способствует регенерации скелетных мышц. Скаффолды, полученные как из аллотрансплантатов, так и из ксенотрансплантатов, часто отвергаются из-за иммунных реакций хозяина, возникающих из-за присутствующих в донорской ткани антигенов. Они обычно обрабатываются при помощи децеллюляризации и/или химического сшивания для удаления или покрытия антигенных молекул. Специфические методы децеллюляризации, похоже, облегчают некоторые из этих проблем для белков внеклеточного матрикса. Однако остаточная ДНК в биологических матрицах после децеллюляризации все еще может индуцировать воспалительные реакции после имплантации.

Закключение. Повреждение скелетной мышечной ткани или атрофия мышц встречается довольно часто. Хирургические методы достигли значительных результатов и могут гарантировать хорошие результаты для восстановления мышечных функций. Однако, при хирургическом вмешательстве всегда остается риск, обусловленный как человеческим фактором, так особенностями операции. Исследования в области тканевой инженерии и регенеративной клеточной терапии могут решить данную проблему. Тканевая инженерия использует биологические скаффолды, которые направляют развитие мышечной ткани при участии факторов роста. Эти клетки способствуют пролиферации миогенных клеток в поврежденных или атрофических мышцах, что отражается на их дальнейшей регенерации. Подобные творческие подходы опираются на глубокое понимание процесса, необходимого для функционального восстановления мышц (реакция клеток на скаффолды, васкуляризация, миогенез и иннервация), однако все равно нуждаются в дальнейших исследованиях.

Список использованных источников:

1. Булякова Н.В., Азарова В.С. Эффективность лазерного воздействия на регенерацию скелетных мышц при различной интенсивности механического повреждения. Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2013. Доступно по: <https://cyberleninka.ru/article/v/effektivnost-lazernogo-vozdeystviya-na-regeneratsiyu-skeletnyh-myshts-pri-razlichnoy-intensivnosti-mehanicheskogo-povrezhdeniya>
2. Корсакова И. Н., Самчук Д. П., Еремин И. И., Зорин В. Л., Деев Р. В., Пулин А. А. Тканеинженерные конструкции для восстановления скелетной мышечной ткани. Гены и клетки. – 2017. doi: 10.23868/201703004
3. Курмашова Е.Д., Яковлева О.В., Ситдикова Г.Ф. Изменение процессов эндоцитоза синаптических везикул в условиях экспериментального сахарного диабета в различных типах мышц. Вестник науки Сибири. – 2015.
4. Шурыгин М. Г., Болбат А. В., Шурыгина И.А. Миосателлиты как источник регенерации мышечной ткани. Фундаментальные исследования. – 2015. doi: 611.018.6:616-003.93
5. L. Vannozzi, L. Ricotti, T. Santaniello et al., “3D porous polyurethanes featured by different mechanical properties: Characterization and interaction with skeletal muscle cells,” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.07.018>
6. Liu J., Saul D., Böker K.O., Ernst J., Lehman W., and Schilling, A.F. “Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration,” *BioMed Research International*, 2018. doi: 10.1155/2018/1984879
7. Luo L., Sun Z., Zhang L. et al, “Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF-beta1 in skeletal muscle during the repair process Lasers,” *Med. Sci.*, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00520-016-3152-z>
8. M. V. Stevanovic, V. G. Cuéllar, A. Ghiassi, and F. Sharpe, “Single-stage Reconstruction of Elbow Flexion Associated with Massive Soft-Tissue Defect Using the Latissimus Dorsi Muscle Bipolar Rotational Transfer,” *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*, 2016. doi:10.1097/gox.0000000000001066
9. Su Z., Robinson A., Hu L. et al., “Acupuncture plus low-frequency electrical stimulation (Acu-LFES) attenuates diabetic myopathy by enhancing muscle regeneration,” *PLoS ONE*, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134511>
10. Yiu E.M., Kornberg A.J., “Duchenne muscular dystrophy” , *J Paediatr Child Health*, 2015. doi: 10.1111/jpc.12868