

УМЕНЬШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ СИЛИКОНА С АДсорБИРОВАННЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

Майбородин И. В.¹, Михеева Т. В.¹, Кузькин С. А.²,
Кадырова А. И.¹, Майбородина В. И.², Шевела А. И.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт химической биологии и фундаментальной медицины»
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск,
Россия

² Институт молекулярной патологии и патоморфологии ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего
образования Российской Федерации, Новосибирск, Россия

Контактная информация:

Майбородин Игорь Валентинович,
ИХБФМ СО РАН, Центр новых
медицинских технологий,
пр-т. акад. Лаврентьева, Новосибирск,
Россия, 8630090.
E-mail: imai@mail.ru

Статья поступила в редакцию 14.11.2018
и принята к печати 13.12.2018.

Резюме

Актуальность. Широкое распространение клеточных технологий рано или поздно неизбежно приведет к введению мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) или их экзосом лицам, имеющим в организме имплантированные искусственные материалы, приживление которых сопровождается сначала острым, а затем хроническим воспалением, очень часто приобретающим гранулематозный характер. Снижение активности воспалительной реакции теоретически может улучшить результаты имплантации.

Цель. Изучить результаты влияния аутологичных ММСК костномозгового происхождения (АММСККП), адсорбированных на силиконе, на воспалительный процесс, сопровождающий имплантацию этого полимера в эксперименте.

Материалы и методы. Методом световой микроскопии изучали в разные сроки состояние тканей вокруг имплантированного силикона с адсорбированными АММСККП.

Результаты. После имплантации силикона с адсорбированными АММСККП, по сравнению с результатами внедрения этого материала без использования клеточных технологий, вокруг инкапсулированного полимера образуется меньший объем рыхлой волокнистой соединительной ткани. В этой соединительной ткани после использования АММСККП через 2 недели ниже абсолютное число всех клеточных элементов, а в течение 1–2 недель — процент и численная плотность нейтрофилов. Наоборот, относительное количество эритроцитов на 1–2 недели и макрофагов на 1–3 недели в условиях применения АММСККП были больше.

Заключение. Меньший объем рыхлой волокнистой соединительной ткани и снижение выраженности клеточной инфильтрации, в частности количества нейтрофилов, вокруг имплантированного с АММСККП силикона, указывают на снижение активности воспалительной реакции в результате применения клеточных технологий, более быстрое очищение послеоперационной раны от детрита, успешность репаративных процессов и создание условий для интеграции инородных тел в организме.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, силикон, воспаление, нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, эритроциты, интеграция инородного тела.

Для цитирования: Майбородин И.В., Михеева Т.В., Кузькин С.А. и соавт. Уменьшение активности воспалительного процесса после имплантации силикона с адсорбированными мультипотентными стромальными клетками. Трансляционная медицина. 2018;5(6): 41–50.

DECREASE IN ACTIVITY OF THE INFLAMMATORY PROCESS AFTER IMPLANTATION OF SILICONE WITH ADSORBED MULTIPOTENT STROMAL CELLS

Maiborodin I. V.¹, Mikheeva T. V.¹, Kuzkin S. A.², Kadyrova A. I.¹,
Maiborodina V. I.², Shevela A. I.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russia

² Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal State Budget Scientific Institution "Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine", Novosibirsk, Russia

Corresponding author:

Maiborodin Igor V.,
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,
Acad. Lavrentieva avenue, Novosibirsk, Russia
E-mail: imai@mail.ru

Received 13 November 2018; accepted
03 December 2018.

Abstract

Background. The wide spread of cellular technologies will sooner or later lead inevitably to the introduction of MMSC or their exosomes to patients who have implanted artificial materials in their organism. The engraftment of foreign bodies is accompanied first by acute and then chronic inflammation, very often acquiring a granulomatous character. A decrease in the activity of the inflammatory response can theoretically improve the results of implantation.

Objective. To study the results of the influence of autologous MMSC of bone marrow origin (AMMSCBMO) adsorbed on silicone, on the inflammatory process that accompanies the implantation of this polymer in the experiment.

Design and methods. In different times, the condition of tissues around the implanted silicone with adsorbed AMMSCBMO was studied by method of light microscopy.

Results. After the implantation of silicone with adsorbed AMMSCBMO, as compared with the results of the introduction of this material without use of cellular technologies, a smaller volume of loose fibrous connective tissue is formed around the encapsulated polymer. In this connective tissue after AMMSCBMO use the absolute number of all cells is lower in 2 weeks, and the percentage and numerical density of neutrophils — within 1–2 weeks. On the contrary, the relative number of erythrocytes within 1–2 weeks and macrophages at 1–3 weeks under the conditions of AMMSCBMO use were greater.

Conclusion. A smaller volume of loose fibrous connective tissue and a decrease in the severity of cellular infiltration, in particular, the number of neutrophils, around the implanted silicone with AMMSCBMO indicates a decrease in the activity of the inflammatory reaction as a result of the use of cellular technologies, more rapid cleansing of postoperative wound from debris, the success of reparative processes and the creation of conditions for the integration of a foreign bodies into the organism.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, silicone, inflammation, neutrophils, lymphocytes, macrophages, erythrocytes, foreign body integration.

For citation: Maiborodin IV, Mikheeva TV, Kuzkin SA et al. Decrease in activity of the inflammatory process after implantation of silicone with adsorbed multipotent stromal cells. Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine. 2018;5(6): 41–50.

Список сокращений:

АММСККП — аутологичные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костномозгового происхождения; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

Введение

За прошедший период мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) были выделены из многочисленных тканей, эти клеточные элементы обладают терапевтической пластичностью и низкой иммуногенностью ввиду способности модулировать иммунитет и стимулировать репарацию, оба эти свойства являются решающими для эффективной клеточной иммунотерапии. ММСК воздействуют на функции важнейших иммуннокомпетентных клеток, участвующих в определении и элиминации алло- и аутоантигенов, в том числе антиген-презентирующих клеток, Т- и В-клеток и натуральных киллерных клеток, что может являться потенциальным средством влияния на различные иммунологические нарушения. Взаимодействие с клеточными элементами систем врожденного и адаптивного иммунитета возможно через прямое взаимодействие ММСК с клетками или посредством секреции определенных цитокинов [1–5].

В настоящее время постоянно расширяется применение различных имплантатов, внедряемых в разные ткани с косметической и лечебной целью, а приживление инородных тел сопровождается сначала острым, а затем хроническим воспалением, очень часто приобретающим гранулематозный характер. Частое использование клеточных технологий рано или поздно неизбежно приведет к введению ММСК лицам, имеющим в организме имплантированные искусственные материалы. Снижение активности воспалительной реакции теоретически может улучшить результаты имплантации. В связи с вышеизложенным была поставлена **цель исследования:** изучить результаты влияния аутологичных ММСК костномозгового происхождения (АММСККП), адсорбированных на силиконе, на воспалительный процесс, сопровождающий имплантацию этого полимера в эксперименте.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы самцы крыс линии Wag весом 180–200 г и возрастом 6 месяцев. Все исследования проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», все манипуляции осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом.

Имплантацию в эксперименте моделировали внедрением под кожу в области правой лопатки плоского фрагмента размером 1 x 1 см стерильной оболочки силиконового имплантата с текстурированной поверхностью E. S. 107K Cristalline Paragel Komuro фирмы Eurosilicone (Франция). Барьерный слой оболочки «Nusil» имеет толщину ≥ 800 мкм со способностью к растяжению $> 500\%$. Область лопатки была выбрана вследствие того, что здесь достаточно выраженная подкожная клетчатка сочетается с легкостью доступа, кроме того, далее животное не сможет преждевременно избавиться от швов.

АММСККП получали и культивировали в соответствии с нашими прошлыми работами [6–10]. Имплантируемый силикон непосредственно перед операцией стерилизовали в пароформалиновой камере вместе с хирургическим инструментарием. Стерильный фрагмент полимера погружали в суспензию АММСККП на 2 часа для пассивной адсорбции в связи с тем, что живые клетки, как и клетки перевиваемых клеточных культур, прикрепляются к любому твердому субстрату [11, 12].

Под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной при соблюдении правил асептики и антисептики после обработки кожи спиртом скальпелем с одноразовым сменным лезвием производили разрез кожи длиной 1,5–2 см на спине животного между лопатками. Тупым способом под кожей формировали канал длиной не менее 2 см от места разреза в сторону правой лопатки. В этот канал вводили стерильный фрагмент оболочки силиконового маммоимплантата, затем послойно ушивали рану непрерывными викриловыми швами и снова обрабатывали кожу спиртом. В качестве контроля использовали животных с имплантацией силикона без адсорбции АММСККП. В каждой группе было 12 животных. Животных выводили из эксперимента через 1, 2, 3 и 4 недели после имплантации. Всего использовано 96 крыс.

Биоптированный силикон вместе с окружающими тканям фиксировали в 4 % растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 часов, обезжизняли в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в гистопласт. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм изучали при увеличении световым микроскопом Axioimager M1 (Zeiss, Германия) до 1200 раз.

Для исследования структурной организации тканей вокруг силикона проводили измерения изображений, полученных при помощи цифровой видеокамеры микроскопа, на экране компьютера с использованием программного обеспечения морфологического модуля Axiovision (Zeiss, Германия). При использовании объектива с увеличением x10

для определения объема тканей вокруг имплантированного полимера конечная площадь тестового прямоугольника была равна $5,6 \times 10^6$ мкм² (стороны $2800 \times 2\,000$ мкм), при подсчете клеток (применение объектива с увеличением $\times 40$) — $8,75 \times 10^4$ мкм² (стороны 350×250 мкм). С каждого среза проводили 3–5 измерений в связи с рекомендациями, что для рандомизированного исследования достаточно 3 срезов [13]. На случайных срезах через силикон с окружающими тканями определяли толщину рыхлой волокнистой соединительной ткани вокруг капсулы с имплантированным полимером, численную плотность всех клеточных элементов на площади 10^5 мкм² и процент отдельных клеток (лимфоцитов, нейтрофилов, эритроцитов и макрофагов) от всего количества.

Статистическую обработку результатов проводили на прикладной статистической программе MS Excel 7.0 (Microsoft, USA), получали среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверность различий сравниваемых средних величин определяли на основании критерия Стьюдента. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем доверительной вероятности 95 % и выше. При расчетах учитывали, что распределение исследуемых признаков было близким к нормальному.

Результаты

На все сроки после имплантации, независимо от адсорбции АММСККП, силикон был окружен толстой капсулой с гиперемизированными сосудами, которая была плотно спаяна с окружающими тканями. Макроскопически капсула имела яркий красный цвет, микроскопически на все сроки наблюдения, даже через 1 неделю после имплантации, состояла из плотной волокнистой соединительной ткани с малым числом сосудов и клеточных элементов.

Сама капсула вокруг полимера была заключена в широкий массив рыхлой волокнистой соединительной ткани, содержащей множество мелких гиперемизированных кровеносных сосудов, фибробластов, различных лейкоцитов и лейкоцитарных инфильтратов. Ширина этой ткани через 1 неделю после хирургического вмешательства без использования АММСККП была больше на 48,2 %; в 3,7 и 29,2 раза соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции. При этом на 2 неделе величина значения этого показателя была выше в 2,5 и 19,7 раза соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели. Объем такой ткани к 3 неделе был больше в 8 раз, чем на 4 неделе (табл. 1, рис. 1).

Слой рыхлой волокнистой соединительной ткани спустя 1 неделю после операции с использова-

нием АММСККП был больше на 50,3; 51,1 и 60,5 % соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции. На 2 неделе величина значения этого показателя была выше в 2,6 и 14,7 раза соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели. Объем такой ткани к 3 неделе был больше в 5,6 раза, чем на 4 неделе (табл. 2, рис. 1). При этом толщина этой ткани на 1, 2 и 3 неделях после имплантации силикона с АММСККП на поверхности была меньше на 47,5; 24,3 и 27,4 % соответственно, чем после внедрения этого материала без использования АММСККП (табл. 1, 2; рис. 1).

Численная плотность всех клеточных элементов в рыхлой волокнистой соединительной ткани вокруг капсулы, изолирующей внедренный полимер, спустя 1 неделю после имплантации без применения АММСККП была больше на 35,7; 91,9 и 91,9 % соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции (табл. 1, рис. 1).

Абсолютное число всех клеток спустя 1 неделю после имплантации силикона с адсорбированными АММСККП было больше на 75; 72,8 и 72,8 %, соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции (табл. 2, рис. 1). При этом к 2 неделе величина значения этого показателя после имплантации полимера с АММСККП была ниже на 46,2 %, чем после внедрения этого материала без АММСККП (табл. 1, 2; рис. 1).

Относительное количество лимфоцитов на 2, 3 и 4 неделях после имплантации силикона без адсорбированных АММСККП было больше в 2,9; 3,6 и 3,7 раза соответственно по сравнению с состоянием на 1 неделе. При этом на 2 неделе величина значения этого показателя была выше на 27,3 и 28,9 % соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели. Содержание лимфоцитов на единицу площади среза на 2 неделе возросло в 2,1 раза относительно 1 недели (табл. 1).

Процент лимфоцитов на 2, 3 и 4 неделях после имплантации силикона с адсорбированными АММСККП было больше в 3,1; 3,6 и 3,6 раза соответственно по сравнению с состоянием на 1 неделе. Численная плотность лимфоцитов на 3 и 4 неделях возросла в 2,1 раза относительно 1 недели (табл. 2).

Относительное число нейтрофилов спустя 1 неделю после имплантации без использования АММСККП было больше в 2,1; 4,1 и 6,8 раза соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции. При этом на 2 неделе величина значения этого показателя была выше на 94 % и в 3,2 раза также соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели. Нейтрофилов к 3 неделе было больше на 66,5 %, чем на 4 неделе (табл. 1).

Таблица 1. Структурная организация рыхлой волокнистой соединительной ткани вокруг силикона, имплантированного без АММСККП ($S \pm \sigma$)

Параметр	Срок после имплантации			
	1 неделя	2 недели	3 недели	4 недели
	1	2	3	4
Ширина ткани, мкм	$956 \pm 125^{2,3,4}$	$645 \pm 51,1^{1,3,4}$	$260 \pm 28,9^{1,2,4}$	$32,7 \pm 3,48^{1,2,3}$
Численная плотность, N_A	$1113 \pm 99^{2,3,4}$	$820 \pm 67,6^1$	580 ± 101^1	580 ± 121^1
Лимфоциты, % то же, N_A	$15,7 \pm 3,22, 3, 4$ $176 \pm 46,52$	$45 \pm 3,781, 3, 4$ $368 \pm 31,91$	$57,3 \pm 3,011, 2$ $333 \pm 67,9$	$58 \pm 4,711, 2$ $339 \pm 88,4$
Нейтрофилы, % то же, (NA)	$61,5 \pm 3,22, 3, 4$ $683 \pm 61,12, 3, 4$	$29,3 \pm 2,821, 3, 4$ $241 \pm 35,51, 3, 4$	$15,1 \pm 2,451, 2, 4$ $87,4 \pm 18,81, 2$	$9,07 \pm 1,531, 2, 3$ $52,1 \pm 11,71, 2$
Эритроциты, % то же, NA	$5,87 \pm 1,132, 3, 4$ $65,3 \pm 13,82, 3, 4$	$2,67 \pm 0,8161$ $21,9 \pm 6,821$	$1,6 \pm 0,6321$ $9,4 \pm 4,221$	$1,73 \pm 0,5941$ $9,93 \pm 3,711$
Макрофаги, % то же, N_A	$5,4 \pm 0,91^{2,3,4}$ $60,1 \pm 11,7^{2,4}$	$12,2 \pm 1,47^{1,4}$ $99,6 \pm 10,9^1$	$16,1 \pm 1,51^1$ $93 \pm 14,6$	$21,5 \pm 2,33^{1,2}$ 123 ± 23^1

Примечание: 1. N_A — численная плотность клеток на 10^5 мкм² площади среза.

2. ^{1,2,3,4} — величины, достоверно различающиеся между собой в данных колонках ($p \leq 0,05$).

Таблица 2. Структурная организация рыхлой волокнистой соединительной ткани вокруг силикона, имплантированного с применением АММСККП ($S \pm \sigma$)

Параметр	Срок после имплантации			
	1 неделя	2 недели	3 недели	4 недели
	1	2	3	4
Ширина ткани, мкм	$636 \pm 78,3^{2,3,4*}$	$427 \pm 35,3^{1,3,4*}$	$162 \pm 19^{1,2,4*}$	$29,1 \pm 3,65^{1,2,3}$
Численная плотность, N_A	$980 \pm 86,2^{2,3,4}$	$560 \pm 98,6^{1*}$	567 ± 118^1	$567 \pm 97,6^1$
Лимфоциты, % то же, (N_A)	$15,3 \pm 3,53^{2,3,4}$ $150 \pm 36,4^{3,4}$	$48 \pm 4,641$ $268 \pm 52,2$	$55,6 \pm 3,021$ $316 \pm 74,51$	$55,4 \pm 3,021$ $313 \pm 53,41$
Нейтрофилы, % то же, NA	$52 \pm 3,182, 3, 4^*$ $510 \pm 53,62, 3, 4^*$	$20,4 \pm 3,251, 3, 4^*$ $114 \pm 27,61, 4^*$	$10,1 \pm 1,551, 2$ $57,5 \pm 15,21$	$8,87 \pm 1,191, 2$ $50 \pm 9,941, 2$
Эритроциты, % то же, NA	$8,67 \pm 0,8162, 3, 4^*$ $85,1 \pm 122, 3, 4$	$5,07 \pm 0,5941, 3, 4^*$ $28,5 \pm 6,711, 3, 4$	$2,2 \pm 0,7751, 2$ $12,1 \pm 4,371, 2$	$1,53 \pm 0,5161, 2$ $8,87 \pm 3,761, 2$
Макрофаги, % то же, NA	$10,1 \pm 1,512, 3, 4^*$ $99,3 \pm 16,6$	$16,8 \pm 1,71, 3, 4^*$ $93,5 \pm 15,9$	$23,3 \pm 1,911, 2^*$ $132 \pm 29,2$	$24 \pm 21, 2$ $137 \pm 32,1$

Примечание: 1. N_A — численная плотность клеток на 10^5 мкм² площади среза.

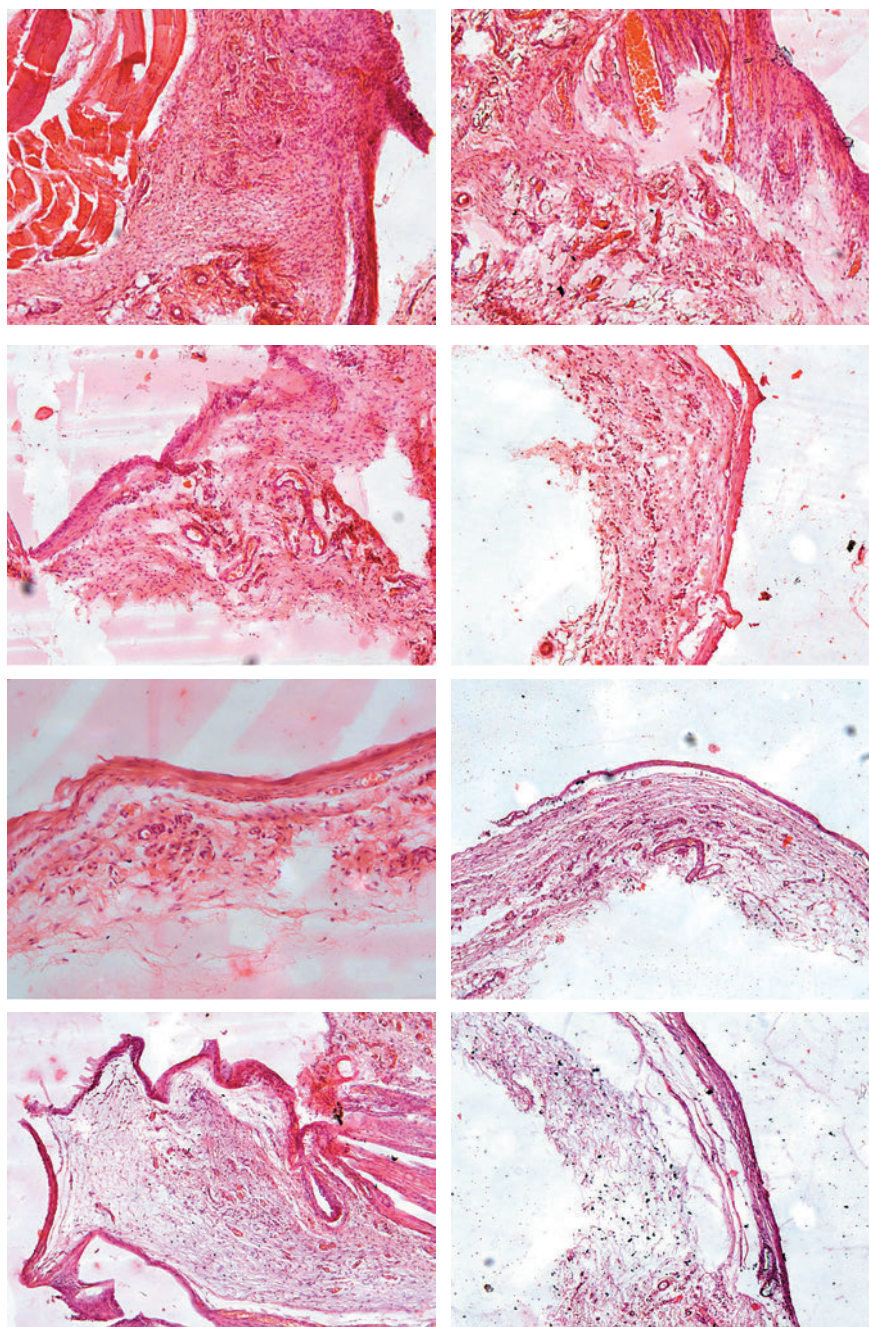
2. ^{1,2,3,4} — величины, достоверно различающиеся между собой в данных колонках ($p \leq 0,05$).

3. * — величины, достоверно отличающиеся от соответствующих у животных после имплантации без АММСККП в таблице 1 ($p \leq 0,05$).

Численная плотность нейтрофильных лейкоцитов к 1 неделе после хирургического вмешательства с имплантацией без адсорбции АММСККП возросла в 2,8; 7,8 и 13,1 раза соответственно относительно состояния через 2, 3 и 4

недели после операции. При этом на 2 неделе величина значения этого показателя увеличилась в 2,8 и 4,6 раза также соответственно и также по сравнению с результатами спустя 3 и 4 недели (табл. 1).

Рис. 1. Ткани крыс через 1 (а, б), 2 (в, г), 3 (д, е) и 4 (ж, з) недели после имплантации силикона без (а, в, д, ж) и с (б, г, е, з) адсорбированными АММСККП. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 70X (а, б, в, г, д) и 50X (е, ж, з).



На все сроки после операции вокруг полимера сформирована капсула из плотной волокнистой соединительной ткани. Далее расположен слой рыхлой волокнистой соединительной ткани, ширина которой на 1 неделе значительна, структуры расположены хаотично, содержат много клеточных элементов и мелких сосудов, похожих на грануляции. Объем этой соединительной ткани в первые недели после хирургического вмешательства без применения АММСККП больше, выше уровень клеточной инфильтрации, чем на соответствующие даты после имплантации с использованием клеточных технологий. По мере увеличения срока после операции толщина рыхлой волокнистой соединительной ткани прогрессивно уменьшается, в ней сокращается количество клеточных элементов. На 3 неделе состояние тканей вокруг имплантированного силикона практически не зависит от использования АММСККП. К 4 неделе ткани вокруг силикона фиброзируются, в капсуле и рядом присутствуют фрагменты полимера (стрелки), окруженные своей собственной капсулой, вокруг которой сохраняются выраженные клеточная инфильтрация и склеротические изменения. Восстанавливается подкожно-жировая клетчатка с низким содержанием клеточных элементов и сосудов.

Процент нейтрофилов спустя 1 неделю после имплантации с использованием АММСККП был больше в 2,5; 5,1 и 5,8 раза соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции. На 2 неделе величина значения этого показателя была выше в 2 и 2,3 раза также соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели (табл. 2). При этом на 1 и 2 неделях после имплантации силикона с АММСККП содержание нейтрофилов было статистически значимо ниже на 18,3 и 43,6 % соответственно по сравнению с данными после внедрения этого материала без АММСККП (табл. 1, 2).

Число нейтрофильных лейкоцитов на единице площади среза к 1 неделе после хирургического вмешательства с имплантацией на фоне использования клеточных технологий возросло в 4,5; 8,9 и 10,2 раза соответственно относительно состояния через 2, 3 и 4 недели после операции. Через 2 недели величина значения этого показателя увеличилась в 2,3 раза по сравнению с результатами спустя 4 недели (табл. 2). При этом через 1 и 2 недели после внедрения силикона с АММСККП этих лейкоцитов было меньше на 33,9 % и в 2,1 раза соответственно по сравнению с данными после имплантации этого материала без использования АММСККП (табл. 1, 2).

Относительное количество эритроцитов на 2, 3 и 4 неделях после имплантации полимера без адсорбированных АММСККП было меньше в 2,2; 3,7 и 3,4 раза соответственно по сравнению с состоянием спустя 1 неделю. Абсолютное число эритроцитов через 2, 3 и 4 недели на фоне внедрения силикона без АММСККП сократилось в 3; 6,9 и 6,6 раза соответственно относительно 1 недели (табл. 1).

Процент эритроцитов на 2, 3 и 4 неделях после имплантации полимера с АММСККП был меньше на 71 %; в 3,9 и 5,7 раза соответственно по сравнению с состоянием спустя 1 неделю. На 2 неделе величина значения этого показателя была выше в 2,3 и 3,3 раза также соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели (табл. 2). При этом на 1 и 2 неделях после имплантации силикона с АММСККП содержание эритроцитов было выше на 47,7 и 89,9 % соответственно относительно результатов внедрения этого материала без использования АММСККП (табл. 1, 2).

Численная плотность эритроцитов через 2, 3 и 4 недели на фоне внедрения полимера с адсорбированными АММСККП сократилась в 3; 7 и 9,6 раза соответственно относительно 1 недели. При этом через 2 недели величина значения этого показателя была выше в 2,4 и 3,2 раза также соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели (табл. 2).

Относительное содержание макрофагов спустя 1 неделю после имплантации без использования АММСККП было меньше в 2,6; 3 и 4 раза соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции. При этом на 2 неделе величина значения этого показателя была ниже на 76,2 % по сравнению с данными через 4 недели. Абсолютное содержание макрофагов через 2 и 4 недели после операции без применения клеточных технологий стало больше на 65,7 % и в 2 раза соответственно, чем на 1 неделе (табл. 1).

Процент макрофагов спустя 1 неделю после имплантации с применением АММСККП было меньше на 66,3 %; в 2,3 и 2,4 раза соответственно относительно состояния на 2, 3 и 4 неделях после операции. При этом на 2 неделе величина значения этого показателя была ниже на 38,7 и 42,9 % соответственно по сравнению с данными через 3 и 4 недели (табл. 2). На 1, 2 и 3 неделях после имплантации силикона с АММСККП фагоцитов было больше на 87; 37,7 и 44,7 % также соответственно, чем после внедрения этого материала без использования АММСККП (табл. 1, 2).

Обсуждение

Рыхлая волокнистая соединительная ткань, расположенная вокруг капсулы с имплантированным силиконом, является по своей сущности проявлением реакций организма на повреждение при операции и внедрении инородного тела. Такая ткань служит своеобразным барьером между поврежденными и неповрежденными тканями, где инактивируются антигены и другие чужеродные вещества, проникающие извне через поврежденный эпителий и образующиеся *in situ* из собственных нежизнеспособных клеточных элементов и тканевых структур, откуда мигрируют лейкоциты и прорастают сосуды, в том числе и при формировании грануляций.

Присутствие множества расширенных полнокровных кровеносных сосудов в данной соединительной ткани, видимо, и обуславливает красный цвет макропрепарата. Грануляции и лейкоцитарная инфильтрация свидетельствуют о том, что воспалительная реакция активна и продолжается даже спустя 4 недели после начала эксперимента с имплантацией силикона.

По мере репарации тканей и образования капсулы вокруг чужеродного объекта объем рыхлой волокнистой соединительной ткани прогрессивно сокращается, но даже к 4 неделе эта ткань полностью не исчезает, что, видимо, обусловлено хроническим воспалительным процессом вокруг инородного тела. Другие исследователи также отмечают

продолжительное время, как минимум до 1 года у крыс, воспалительной реакции, идущей вокруг имплантированных биологически неактивных, нейтральных материалов [14, 15].

В связи с иммуномодуляторным действием АММСККП [1–5] происходит ингибирование острой [2–4] и хронической [1, 5, 16] воспалительной реакции. Супрессируются активность и функции иммунокомпетентных клеток, таких как лимфоциты [5, 16] и нейтрофилы [17, 18]. Вследствие этого возможно замедление очищения хирургических ран от детрита и, соответственно, замедление регенераторных процессов.

Однако меньший объем рыхлой волокнистой соединительной ткани в условиях применения клеточных технологий свидетельствует, наоборот, об ускорении репарации. Вместе с этим, введенные АММСККП элиминируются из тканей в месте введения и из структур, созданных с их участием, макрофагами [9, 10]. Детрит ММСК из тканей также фагоцитируется макрофагами [9, 10]. По-видимому, ММСК, даже аутологичные и генетически идентичные, в результате культивирования приобретают какие-то антигенные свойства и вызывают ответную реакцию иммунокомпетентных клеток.

В связи с этим можно предположить, что, так как ММСК и их детрит стимулируют миграцию макрофагов, то эти фагоциты будут фагоцитировать не только АММСККП, но и более активно поглощать послеоперационный детрит, таким образом более быстро очищая рану и стимулируя репаративные процессы. Согласно данным литературы, митохондриальные передачи от ММСК к макрофагам повышают макрофагальный фагоцитоз и оксидативное фосфорилирование [19].

Следует учитывать, что макрофаги принимают активное участие в процессах синтеза и лизиса компонентов соединительной ткани. То есть привлечение АММСККП и их детритом большого числа макрофагов к месту внедрения силикона, а также их активация [19], позволят более быстро сформировать плотную соединительнотканную капсулу вокруг инородного тела и в более короткий срок заживить рану после хирургического вмешательства для имплантации, что, несомненно, окажет положительное воздействие на процессы интеграции инородного тела.

Адсорбированные на силиконе АММСККП после имплантации мигрируют в рядом расположенные ткани, где за счет ангиогенного действия могут дифференцироваться в эндотелиоциты и перициты [6, 8] и участвовать в формировании грануляций [7]. За счет этого грануляционная ткань образуется быстрее, содержит больше сосудов, и, по-видимо-

му, также способствует более быстрому очищению послеоперационной раны и ходу репаративных процессов. Вместе с этим, не исключено более легкое повреждение этих грануляций и появление большего числа эритроцитов в тканях.

Затем, по мере инволюции грануляций и удаления из сосудистых оболочек клеточных элементов, сформированных из дифференцирующихся АММСККП, показатели численности эритроцитов нормализуются. Необходимо отметить, что максимально элиминация ММСК из тканей и структур, созданных с их участием, у крыс происходит на 2–3 неделях [9, 10].

Прогрессивное уменьшение содержания всех лейкоцитов на единице площади среза ткани, скорее всего, обусловлено уменьшением активности воспаления и успешной регенерацией тканей, поврежденных во время хирургического вмешательства и имплантации. Более быстрое уменьшение лейкоцитарной инфильтрации в результате применения клеточных технологий, наиболее вероятно, связано с иммуномодуляторным действием АММСККП [1–5]. Вследствие такого действия подавляется воспалительная реакция [1–5, 16], и лейкоцитарная инфильтрация в тканях вокруг внедренного силикона снижается более выражено [17].

Начиная с 3 недели эксперимента, по-видимому, действие АММСККП прекращается из-за их деструкции, и далее интенсивность воспаления и, соответственно, лейкоцитарная инфильтрация не зависят от эффекта введенных АММСККП. Согласно литературным данным, именно на 2–3 неделях после введения в организм ММСК происходит их максимальная элиминация, в том числе замещение ММСК в структурах, созданных с их участием, собственными клетками реципиентного организма [6–10].

Соотношение численности лимфоцитов и нейтрофилов также свидетельствует о постепенном снижении интенсивности воспаления, очищении тканей от антигенов и продолжающихся репаративных процессах. Но даже спустя 4 недели после имплантации в тканях все еще много нейтрофилов, что может указывать на хронизацию воспалительного процесса, поддерживаемого наличием инородного тела в ткани.

Более низкие показатели содержания нейтрофилов спустя 1–2 недели после имплантации силикона с адсорбированными АММСККП, чем после такой же операции с внедрением этого же материала, но без использования АММСККП, главным образом, указывает на более слабую воспалительную реакцию вследствие их иммуномодуляторного действия [1–5] и подавление активности клеточ-

ных элементов миелоидного происхождения [17, 18]. Это может снизить уровень экзоцитоза лизосомальных ферментов лейкоцитами [20] и, соответственно, повреждения ими собственных тканей.

При анализе полученных данных не найдено статистически достоверных отличий численности лимфоцитов в рыхлой волокнистой соединительной ткани вокруг имплантированного полимера между животными с внедрением силикона с адсорбированными АММСККП и без них. Возможно, что рост численности лимфоцитов по мере затихания острого воспаления, начала хронического и инкапсуляции полимера маскирует ожидаемое иммуномодуляторное действие АММСККП на эти клеточные элементы [6, 16].

Постепенное нарастание численности клеток макрофагального ряда, наиболее вероятно, обусловлено хронизацией воспалительного процесса, поддерживаемого присутствием инородного тела. Макрофаги пытаются фрагментировать и лизировать инородное тело, принимают участие в формировании и функционировании соединительной ткани, отграничивающей силикон от живых тканей организма, фагоцитируют и лизируют тканевую дестрит, образующийся в тканях при смещении инородного тела и обострениях перифокальной воспалительной реакции.

По-видимому, вследствие супрессии АММСККП функций клеточных элементов миелоидного ряда [17, 18] и уменьшения их количества, в рыхлой волокнистой соединительной ткани возрастает процент макрофагов, при этом их абсолютное содержание остается постоянным. Следует еще раз отметить возможность стимуляции макрофагов ММСК [19].

Заключение

Таким образом, после имплантации силикона с адсорбированными АММСККП, по сравнению с результатами внедрения этого материала без использования клеточных технологий, вокруг инкапсулированного полимера образуется меньший объем рыхлой волокнистой соединительной ткани. В этой соединительной ткани после использования АММСККП через 2 недели ниже абсолютное число всех лейкоцитов, а в течение 1–2 недель — процент и численная плотность нейтрофилов. Наоборот, относительное количество эритроцитов на 1–2 неделях и макрофагов на 1–3 неделях в условиях применения АММСККП было больше. Полученные данные свидетельствуют о меньшей активности воспалительного процесса, вызванного повреждением тканей при хирургическом вмешательстве и имплантации в условиях использования

клеточных технологий, что может оказать положительное воздействие на процессы интеграции инородных тел.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена при финансовой поддержке ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.62.2.1, 0309-2016-0006) «Разработка технологий получения материалов для регенеративной медицины и развитие методов восстановления репродуктивного здоровья».

Список литературы / References

1. Abumaree MH, Abomaray FM, Alshabibi MA et al. Immunomodulatory properties of human placental mesenchymal stem/stromal cells. *Placenta*. 2017;59: 87–95.
2. Lopez-Santalla M, Mancheño-Corvo P, Escolano A et al. Biodistribution and efficacy of human adipose-derived mesenchymal stem cells following intranodal administration in experimental colitis. *Front Immunol*. 2017;8: 638.
3. Shree N, Venkategowda S, Venkatrangan MV et al. Treatment with adipose derived mesenchymal stem cells and their conditioned media reverse carrageenan induced paw oedema in db/db mice. *Biomed Pharmacother*. 2017;90: 350–353.
4. de Witte SFH, Merino AM, Franquesa M et al. Cytokine treatment optimises the immunotherapeutic effects of umbilical cord-derived MSC for treatment of inflammatory liver disease. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):140.
5. Zhang X, Huang W, Chen X et al. CXCR5-overexpressing mesenchymal stromal cells exhibit enhanced homing and can decrease contact hypersensitivity. *Mol Ther*. 2017;25(6):1434–1447.
6. Maiborodin IV, Yakimova NV, Matveyeva VA et al. Angiogenesis in rat uterine cicatrix after injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;150(6):756–761. [Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А. и др. Ангиогенез в рубце матки крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010;150(12):705–711].
7. Maiborodin IV, Shevela AI, Matveeva VA et al. Angiogenesis in granulation tissue after implantation of polyhydroxyalkanoate with mesenchymal stem cells. *Novosti Khirurgii*. 2013;21(2):29–36. In Russian [Майбородин И.В., Шевела А.И., Матвеева В.А. и др. Ангиогенез в грануляционной ткани после имплантации полигидроксиалканата с мезенхимальными стволовыми клетками. *Новости хирургии*. 2013;21(2):29–36].
8. Maiborodin I.V., Onoprienko N.V., Chastikin G.A. Morphological changes in rat uterine tissues and possibility of spontaneous labor as a result of injection of multipotent mesenchymal stromal cells against the background of hydrometra. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015;159(4): 511–516. In Russian. [Майбо-

родин И.В., Оноприенко Н.В., Частикин Г.А. Морфологические изменения тканей матки крыс и возможность самопроизвольных родов в результате введения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток на фоне гидрометры. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015;159(4): 511–516].

9. Maiborodin IV, Morozov VV, Anikeev AA et al. Macrophage reaction to multipotent mesenchymal stromal cells introduction into surgical trauma site in rats. *Novosti Khirurgii*. 2017;25(3):233–241. In Russian [Майбородин И.В., Морозов В.В., Аникеев А.А. и др. Макрофагальный ответ у крыс на введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в регион хирургической травмы. *Новости хирургии*. 2017;25(3):233–241].

10. Maiborodin IV, Maslov RV, Mikheeva TV et al. Macrophage adsorption of multipotent mesenchymal stromal cells and their debris from vascular bed proves the migration of these cellular elements through the vessels after tissue injection. *Molekulyarnaya meditsina*. 2018;16(4):56–61. In Russian [Майбородин И.В., Маслов Р.В., Михеева Т.В. и др. Макрофагальная адсорбция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток как доказательство их миграции по сосудам после тканевой инъекции. *Молекулярная медицина*. 2018;16(4):56–61].

11. Krymskij LD, Nestajko GV, Rybalov AG. Raster electron microscopy of vessels and blood. M.: Medicina, 1976. 168 p. In Russian [Крымский Л. Д., Нестайко Г. В., Рыбалов А. Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. М.: Медицина, 1976. 168 с.].

12. Volkova OV, Shahlamov VA, Mironov AA. Atlas of the scanning electron microscopy of cells, tissues and organs. M.: Medicina, 1987. 464 p. In Russian [Волкова О. В., Шахламов В. А., Миронов А. А. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов. М.: Медицина, 1987. 464 с.].

13. Head JR, Seeling LL Jr. Lymphatic vessels in the uterine endometrium of virgin rats. *J Reprod Immunol*. 1984;6(3):157–166.

14. Maiborodin IV, Kuznetsova IV, Beredovoi EA et al. Reaction of rat tissues to implantation of lactic acid-based biodegradable polymer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;156(6):874–879. [Майбородин И.В., Кузнецова И.В., Береговой Е.А. и др. Реакция тканей крыс на имплантацию биodeградируемого полимера на основе молочной кислоты. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013;156(12):848–853].

15. Kuznetsova IV, Maiborodin IV, Shevela AI et al. Local tissue reaction to implantation of biodegradable suture materials. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;157(3):390–394. [Кузнецова И.В., Майбородин И.В., Шевела А.И. и др. Реакция окружающих тканей на имплантацию абсорбируемых шовных материалов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014;157(3):375–380].

16. Stenger EO, Chinnadurai R, Yuan S et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with sickle cell disease display intact functionality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(5):736–745.

17. Amouzegar A, Mittal SK, Sahu A et al. Mesenchymal stem cells modulate differentiation of myeloid progenitor cells during inflammation. *Stem Cells*. 2017;35(6):1532–1541.

18. Takeyama H, Mizushima T, Uemura M et al. Adipose-derived stem cells ameliorate experimental murine colitis via *tsp-1*-dependent activation of latent TGF- β . *Dig Dis Sci*. 2017;62(8):1963–1974.

19. Jackson MV, Krasnodembskaya AD. Analysis of mitochondrial transfer in direct co-cultures of human monocyte-derived macrophages (MDM) and mesenchymal stem cells (MSC). *Bio Protoc*. 2017;7(9). pii: e2255.

20. Fredriksson MI, Gustafsson AK, Bergstrom KG, et al. Constitutionally hyperreactive neutrophils in periodontitis. *J Periodontol*. 2003;74(2):219–224.

Информация об авторах:

Майбородин Игорь Валентинович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории стволовой клетки Центра новых медицинских технологий, ИХБФМ СО РАН;

Михеева Татьяна Владимировна, к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки Центра новых медицинских технологий, ИХБФМ СО РАН;

Кузькин Сергей Александрович, очный аспирант лаборатории ультраструктурных основ патологии Института молекулярной патологии и патоморфологии, ФИЦ ФТМ;

Кадырова Алия Ишенбековна, к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки Центра новых медицинских технологий, ИХБФМ СО РАН;

Майбородина Виталина Игоревна, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных основ патологии Института молекулярной патологии и патоморфологии, ФИЦ ФТМ;

Шевела Андрей Иванович, д.м.н., профессор, заслуженный врач России, заведующий отделом «Центр новых медицинских технологий», ИХБФМ СО РАН.

Author information:

Maiborodin Igor V., PhD, Professor, Chief Researcher of the Stem Cell Laboratory, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch;

Mikheeva Tatyana V., PhD, the Stem Cell Laboratory, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch;

Kuzkin Sergei A., Full-time graduate student, Laboratory of ultrastructural bases of pathology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal State Budget Scientific Institution “Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine”;

Kadyrova Aliya I., PhD, the Stem Cell Laboratory, the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch;

Maiborodina Vitalina I., MD, Leading Researcher, Laboratory of ultrastructural bases of pathology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal State Budget Scientific Institution “Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine”;

Shevela Andrey I., PhD, Professor, Head of the Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.