

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Klinichna khirurgiia. 2019 June;86(6):53-59.  
DOI: 10.26779/2522-1396.2019.06.53

## Имплантация коллагеновой мембраны с адсорбированными мультипотентными стромальными клетками в эксперименте

И. В. Майбородин<sup>1</sup>, С. В. Хоменюк<sup>1</sup>, Т. В. Михеева<sup>1</sup>, Г. Ю. Ярин<sup>2</sup>, В. И. Майбородина<sup>3</sup>,  
Н. В. Оноприенко<sup>4</sup>, И. А. Вильгельми<sup>2</sup>, А. И. Шевела<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск,

<sup>2</sup>Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии МЗ РФ,

<sup>3</sup>Институт молекулярной патологии и патоморфологии

Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины МНВО РФ, г. Новосибирск,

<sup>4</sup>Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ

## Implantation of the collagen membrane with adsorbed multipotent stem cells in experiment

I. V. Mayborodin<sup>1</sup>, S. V. Khomenyuk<sup>1</sup>, T. V. Mikheyeva<sup>1</sup>, G. Yu. Yarin<sup>2</sup>, V. I. Mayborodina<sup>3</sup>,  
N. V. Onopriyenko<sup>4</sup>, I. A. Vilgelmi<sup>2</sup>, A. I. Shevela<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SD of RAS, Novosibirsk,

<sup>2</sup>Novosibirsk Scientific–Investigation Institute of Traumatology and Orthopedics,

<sup>3</sup>Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology

Federal Investigation Centre of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk,

<sup>4</sup>Novosibirsk State Medical University

### Реферат

**Цель.** Проследить процессы, которые происходят с аутологичными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) костномозгового происхождения после имплантации их в организм на поверхности коллагенового материала в эксперименте.

**Материалы и методы.** Методами световой микроскопии с применением люминесценции изучали изменения подкожно–жировой клетчатки крыс после имплантации коллагеновой мембраны с пассивно адсорбированными на поверхности ММСК с трансфицированным геном GFP и дополнительно окрашенными Vybrant® CM–Dil клеточными мембранами.

**Результаты.** При использовании люминесценции через 1 нед после имплантации коллагенового материала с адсорбированными ММСК рядом с имплантатом были найдены типичные очень мелкие сосуды с однослойной оболочкой, которая очень интенсивно флуоресцировала при установке родаминового фильтра. На 2–й неделе на периферии коллагенового материала и рядом с имплантатом на фоне применения родаминового фильтра красным цветом светились только мелкие включения в макрофагах. В последующем постепенно уменьшались как число таких светящихся объектов, вплоть до единичных, которых находили очень редко, так и интенсивность их флуоресценции.

**Выводы.** Основной причиной усиления васкуляризации тканей вокруг имплантированного коллагена с адсорбированными на поверхности ММСК является дифференцирование их в клеточные элементы сосудистых оболочек. Начиная со 2–й недели все ММСК подвергаются деструкции и фагоцитируются макрофагами, также к этому сроку исчезают структуры из этих ММСК в результате их дифференцирования, в том числе и сосуды.

**Ключевые слова:** коллаген; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; имплантация; ангиогенез; макрофаги.

### Abstract

**Objective.** To follow–up the processes, taking place with autologous multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) of the bone marrow origin after their implantation into the organism on surface of the collagen material in experiment.

**Materials and methods.** The changes in subcutaneous adipose cellular tissue in rats after implantation of the collagen membrane with passively adsorbed on the MMSC on the surface with transfected gene GFP and additionally stained cellular membranes with Vybrant® CM–Dil were studied up, using the light microscopy methods and a luminescence.

**Results.** While application of a luminescence in a one week after implantation of the collagen material with the MMSC adsorbed in a neighborhood with the implant there were revealed typical very small vessels owing a one–layer membrane, which have fluoresced intensely while a rodamine filter was installed. On the second week on periphery of the collagen material and in neighborhood to the implant on background of a rodamine filter application only small inclusions inside macrophages were shining with a red color. Subsequently step by step the quantity of such shining objects have reduced down to solitary ones, presenting very rarely, as well as their fluorescence intensity.

**Conclusion.** The main cause for the tissue vascularization enhancement around the implanted collagen with the MMSC adsorbed on the surface is their differentiation into cellular elements of vascular membranes. Starting from the second week all the MMSC undergo destruction and are phagocytized by macrophages, also in this term the structures from these MMSC disappear as a result of their differentiation, including the vessels.

**Keywords:** collagen; multipotent mesenchymal stem cells; implantation; angiogenesis; macrophages.

Среди биополимеров, применяемых для создания имплантатов, особое место занимают быстро и безусловно биодеградируемые материалы. Изделия на основе коллагена являются в большой мере интересными для клинической медицины из-за их механической прочности, значительной биосовместимости, полной и быстрой абсорбции. Коллагеновые матрицы, или скаффолды, очень часто используют для доставки мультипотентных стромальных клеток (МСК) в организм. В базе данных "PubMed" находим более 10 000 публикаций при поиске по ключевым словам "stem cells collagen".

Изделия низкой жесткости на основе коллагена I типа (гемостатическая пена) применяют в качестве миметической ниши для МСК человека с целью сохранения их стволовой структуры *in vitro*. Инертная микросреда пены на основе коллагена позволяет 80% культивируемых МСК оставаться жизнеспособными [1].

Создание функциональных васкуляризированных тканей является ключевой задачей в области тканевой инженерии. Прежде чем клиническая имплантация таких тканевых конструкций станет успешной, необходимо усилить неоваскуляризацию. Для сокультивирования остеогенных дифференцирующихся МСК человека с эндотелиальными клетками использовали каркасы из коллагенового гидрогеля. Было доказано предпочтительное применение связывающих способностей естественных гидрогелей [2].

Регенерация тканей пародонта все еще остается проблемой в периодонтологии. В связи с этим изучали регенеративный потенциал различных коллагеновых матриц для стволовых клеток периодонтальной связки. С использованием указанных материалов были обработаны 60 дефектов фуркаций II класса. Наблюдали значительное усиление регенерации, восстановление адгезии достигало 77% (в контрольной группе – 13%) [3].

Имплантированные для реконструкции тканей МСК очень быстро подвергаются деструкции, поскольку на них воздействуют неспецифические сигналы воспаления, генерируемые в среде раны и в ответ на любое имплантированное инородное тело. МСК, выращенные на компоненте внеклеточного матрикса Tenascin-C и коллагене I типа (так как Tenascin сам по себе является антиадгезивным), выживали преимущественно в присутствии индуктора апоптоза FasL [4, 5].

Практически во всех публикациях, посвященных использованию коллагена в качестве матриц для МСК, отмечается хорошее взаимодействие между биополимером и клетками. Вместе с этим в научной литературе явно недостаточно данных о реакциях живого организма на коллагеновые материалы именно с адсорбированными МСК. До конца не понятно, что происходит с МСК при внедрении имплантата с ними в организм в условиях хирургического вмешательства. Кроме того, некоторые исследователи сообщают о возможности инкапсуляции в тканях организма абсорбируемых шовных материалов и развития гранулематозных реакций на их имплантацию [6, 7].

Цель исследования: в связи с явной недостаточностью данных о том, что происходит с МСК, внедряемыми в ткани на поверхности коллагенового материала, проследить изменения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения (АММСККП) после имплантации их в организм на поверхности коллагенового материала в эксперименте.

### **Материалы и методы исследования**

Работа основана на результатах морфологического исследования изменений подкожно-жировой клетчатки крыс-самцов инбредной линии Wag массой тела 180–200 г в возрасте 6 мес в разные сроки после имплантации коллагеновой мембраны с адсорбированными АММСККП в межлопаточную область. Все манипуляции с крысами выполняли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

#### *Получение, характеристика и подготовка АММСККП для адсорбции на полимере в эксперименте*

АММСККП второго пассажа, полученные от крысы линии Wag, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., США), содержащей ген зеленого флюоресцентного белка GFP, который характеризуется двумя пиками поглощения при длинах волн 395 нм (основной) и 475 нм (минорный) и пиком флюоресценции на длине волны 498 нм, под контролем промотора цитомегаловируса и ген устойчивости к неомицину под контролем промотора вируса SV40, необходимого для последующей селекции с использованием дженетицина G418 (pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc., США). Трансфекцию проводили в присутствии реагента для трансфекции TurboFect (Fermentas life sciences, Inc, Канада) согласно рекомендациям производителя, применяя протокол для трансфекции суспензионных клеток и используя  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл суспензии, 4 мкг ДНК плазмиды и 10 мкл реагента для трансфекции (TurboFect) [8, 9].

Кроме того, клеточные мембраны АММСККП окрашивали раствором Vybrant® CM-Dil (Thermo Fisher Scientific, США) (максимальная абсорбция на длине волны 553 нм, эмиссия на длине волны 570 нм), который применяют для окрашивания мембран живых суспензионных или прикрепившихся клеток.

Через 2 ч после трансфекции плазмидной ДНК белка GFP к суспензии АММСККП добавляли краситель Vybrant® CM-Dil из расчета 5 мкл раствора на  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл среды без сыворотки, мягко тщательно перемешивали пипетированием и оставляли на 20 мин в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре 37°C в условиях насыщенной влажности. Затем АММСККП центрифугировали 5 мин при 1500 оборотов в 1 мин, среду с красителем удаляли, к АММСККП добавляли новую порцию теплой среды. Данную процедуру удаления красителя проводили три раза. Затем АММСККП ресуспендировали в теплой среде в объеме из расчета  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл [8, 9].

*Биопластический коллагеновый материал, имплантированный с АММСККП в подкожно-жировую клетчатку крыс*

В качестве коллагенового материала использовали стерильные мембраны Bio-Gide (резорбируемая двухслойная коллагеновая мембрана размерами 30 × 40 мм, состоящая из свиного коллагена I и III типов высокой степени очистки без поперечных связей; производитель Geistlich, Швейцария), приобретенные в розничной аптечной сети. Непосредственно перед операцией из коллагенового материала вырезали прямоугольные фрагменты размерами 5 × 5 мм, которые погружали в суспензию АММСККП на 2 ч для пассивной адсорбции с учетом того, что живые клетки, как и клетки перевиваемых клеточных культур, прикрепляются к любому твердому субстрату [10].

*Хирургическое вмешательство для имплантации коллагеновой мембраны с адсорбированными АММСККП в эксперименте*

Под общим ингаляционным эфирным наркозом, в условиях чистой операционной, при соблюдении правил асептики и антисептики, после обработки кожи спиртом скальпелем с одноразовым сменным лезвием выполняли разрез кожи длиной 1,5–2 см на спине животного между лопатками. Область лопатки была выбрана исходя из того, что здесь достаточно выраженная подкожная клетчатка сочетается с легкостью доступа, кроме того, далее животное не сможет преждевременно избавиться от швов. Тупым способом под кожей формировали канал длиной не менее 2 см от места разреза в сторону правой лопатки, в него вводили стерильный фрагмент коллагеновой мембраны, затем послойно ушивали рану непрерывными викриловыми швами и снова обрабатывали кожу спиртом. Коллаген с АММСККП имплантировали в сформированный канал для того, чтобы избежать влияния шовного материала и поврежденной кожи на воспалительный процесс в области полимера [9, 11].

В каждой группе было по 12 животных. Всего использовано 48 крыс. Животных выводили из эксперимента че-

рез 1, 2, 3 и 4 нед после имплантации. Гибели крыс после хирургического вмешательства не зафиксировали, как и гнойно-воспалительных осложнений в месте операции.

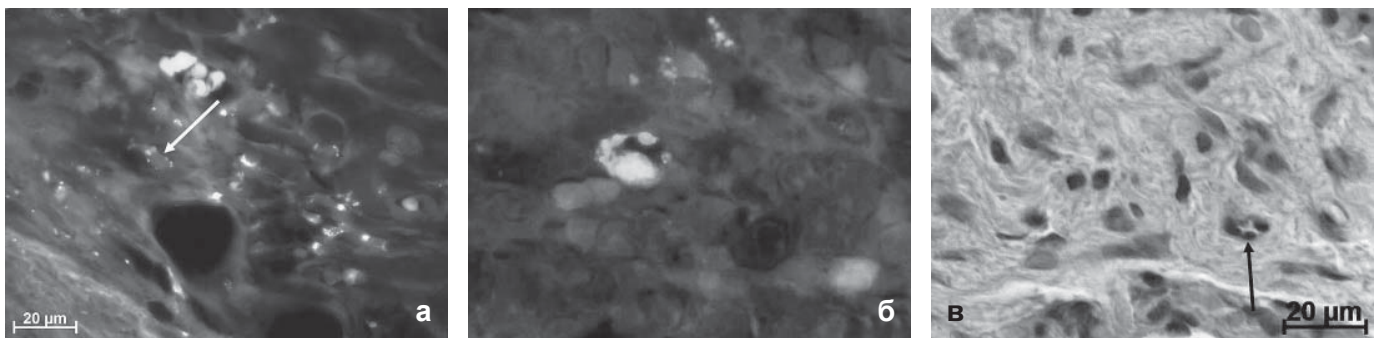
*Подготовка объектов для изучения морфологическими методами*

Спустя 1, 2, 3 и 4 нед после имплантации коллагенового материала животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза, биооптированный коллаген вместе с окружающими тканями фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 ч, обезживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в гистопласт. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, изучали с помощью светового микроскопа Axioimager M1 (Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз.

Также неокрашенные срезы исследовали в режиме люминесценции указанного микроскопа с фильтрами Alexa Fluor 488 (диапазон возбуждения 450–490 нм, диапазон регистрации 515–∞ нм) или родаминового (Rhod – диапазон возбуждения 540–552 нм, диапазон регистрации 575–640 нм). При получении микрофотографий использовали автоматическую экспозицию. В процессе совмещения изображений с применением фильтров Alexa Fluor 488 и родаминового можно получить зеленый и красный (или оранжевый и желтый) цвет в зависимости от преобладания интенсивности свечения при использовании того или иного фильтра. Зеленый цвет дает более яркая флуоресценция при использовании фильтра Alexa Fluor 488, красный – при использовании родаминового фильтра, желтый и его оттенки получаются в результате смешения зеленого и красного цветов в той или иной пропорции [8, 9].

## Результаты

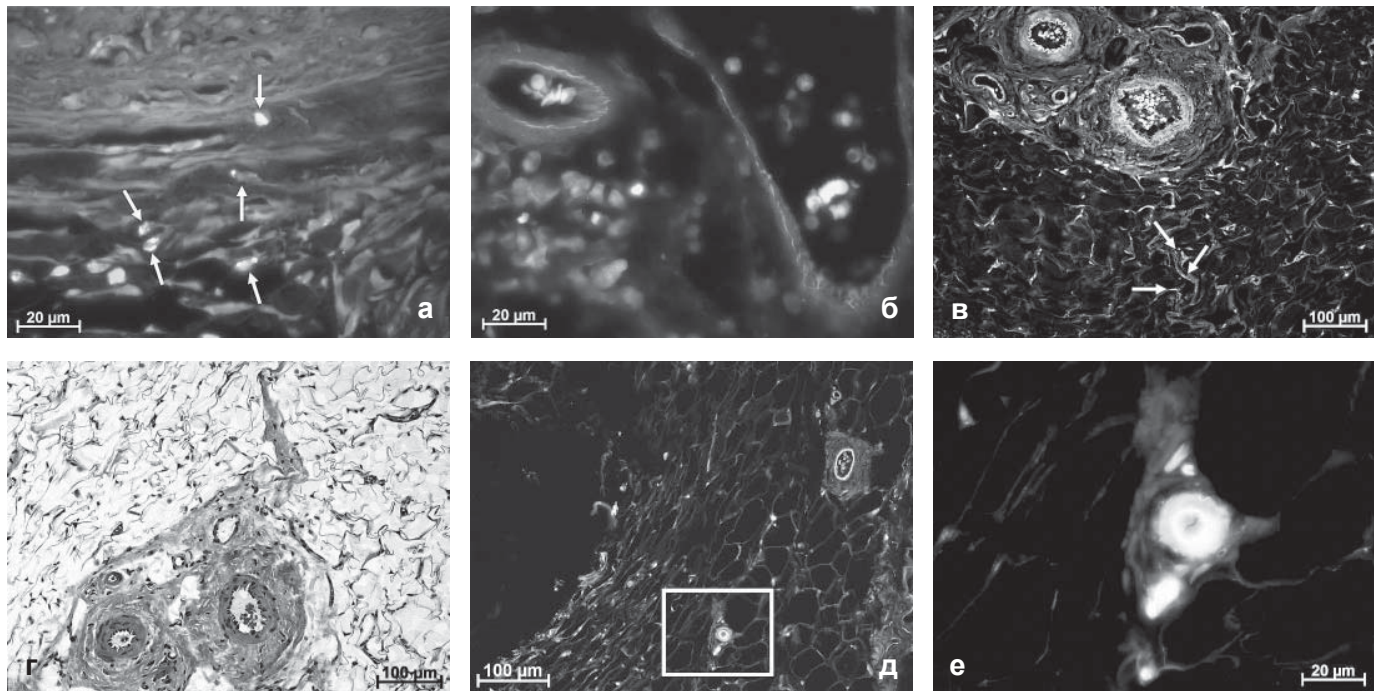
Через 1 нед после имплантации коллагенового материала с адсорбированными АММСККП при изучении не-



*Рис. 1.*

*Коллагеновая мембрана с адсорбированными АММСККП через 1 нед после имплантации:*

- а – отдельные клеточные элементы содержат множество мелких овальных включений с четкими краями, которые очень ярко светятся при установке родаминового фильтра, иногда заметен более темный центр клеточных элементов с такими включениями (указано стрелкой). Результат компьютерного совмещения изображений, полученных с неокрашенных срезов в люминесцентном режиме микроскопа при использовании фильтров Alexa 488 и родаминового (то же на рис. 1, б; 2, а–в, д; 3, а, б; 4);*
- б – в коллагеновом материале расположен сосуд со сформированным просветом и тонкой однослойной стенкой из клеток, ярко светящихся при установке родаминового фильтра;*
- в – инфильтрация коллагенового имплантата клетками, среди которых содержатся сосуды капиллярного типа с просветом и однослойной стенкой (указано стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином.*



*Рис. 2.*

*Ткани, окружающие имплантированный коллагеновый материал с адсорбированными АММСККП на 2-й неделе после операции: а – в непосредственной близости от края коллагеновой мембраны в клетчатке некоторые клеточные элементы содержат множество включений разного размера с четкими краями, которые интенсивно флуоресцируют при использовании родаминового фильтра (указано стрелками); б – интенсивная флуоресценция эндотелия и эластиновых структур оболочки мелких сосудов клетчатки, окружающей имплантированный коллаген, при установке родаминового фильтра; в – в подкожно-жировой клетчатке рядом с имплантатом ярко светится красным цветом эндотелий сосудов – артерий, вен и мелких капилляров (указано стрелками); г – группа склерозированных сосудов в подкожно-жировой клетчатке (окраска гематоксилином и эозином); д – в подкожно-жировой клетчатке, окружающей коллаген, ярко светится красным цветом эндотелий артерий; е – интенсивная красная флуоресценция эндотелия мелкой артерии.*

окрашенных гистологических срезов с использованием люминесценции рядом с имплантатом было найдено множество мелких овальных объектов с четкими краями, которые очень ярко светились при установке родаминового фильтра, иногда было заметно расположение таких светящихся объектов на периферии более темной структуры (рис. 1а). Иногда на краю коллагеновой мембраны обнаруживали типичные очень мелкие сосуды с однослойной оболочкой, которая очень интенсивно флуоресцировала при использовании родаминового фильтра (рис. 1б, в).

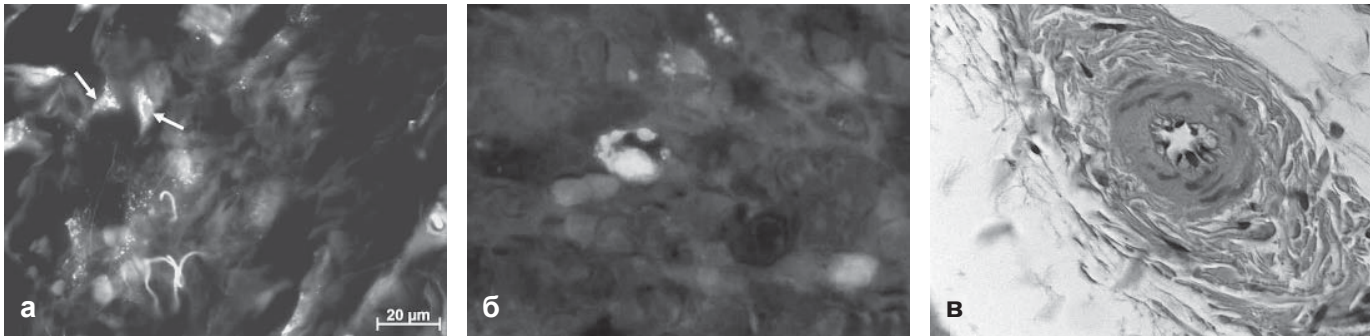
На 2-й неделе не было зарегистрировано на периферии коллагенового материала и рядом с имплантатом четко дифференцируемых структур, построенных из клеток с преимущественной флуоресценцией при установке родаминового фильтра. На таких участках красным цветом светились только мелкие включения в отдельных клеточных элементах (рис. 2а).

Необходимо обратить внимание еще на один феномен, обнаруженный на 2-й неделе после имплантации коллагенового изделия с адсорбированными АММСККП, мембраны которых были мечены красителем Vybrant® CM-Dil. Оболочки крупных и мелких сосудов (вен, артерий и капилляров), расположенных в подкожно-жировой клетчатке на некотором удалении от места операции, приобрели способность к очень интенсивной люминесценции при использовании родаминового фильтра. Было

получено не избирательное окрашивание эндотелиальной выстилки и эластиновых структур сосудистой стенки. Причем это было не единичной находкой, такое свечение наблюдали на срезах 8 из 12 животных этой группы (рис. 2б-е).

К 3-й неделе на неокрашенных срезах в условиях флуоресцентной микроскопии уже четко нельзя было разграничить периферию коллагенового материала и окружающие ткани. На отдельных участках находилось очень много мелких частиц с интенсивной люминесценцией на фоне применения родаминового фильтра. Создавалось впечатление, что часть таких объектов (более ярких) была расположена внеклеточно, непосредственно в тканевых структурах, тогда как другие объекты (более крупные и с оранжевым, а не красным свечением) являлись цитоплазмными включениями клеточных элементов. Вместе с этим не исключено, что все мелкие ярко светящиеся частицы также содержались в цитоплазме клеток, скорее всего, фагоцитов (рис. 3а).

Флуоресценция эндотелия и других структур сосудов окружающей клетчатки стала менее интенсивной (практически оранжевая или даже желтая), чем спустя 2 нед после имплантации. Вместе с этим было отмечено и характерное свечение паравазальных структур, похожих на эластиновые волокна и расположенных на довольно значительном удалении от эндотелия и просвета сосуда (рис. 3б, в).



*Рис. 3.*

*Клетчатка вокруг имплантированной с адсорбированными АММСККП коллагеновой мембраны спустя 3 нед после хирургического вмешательства:*

*а – в тканях содержится очень много мелких частиц с интенсивной флюоресценцией при использовании родаминового фильтра, некоторые более мелкие частицы расположены, скорее всего, внеклеточно, остальные, несомненно, в клетках (указано стрелками); б – флюоресценция эндотелия и эластиновых структур оболочки сосуда при установке родаминового фильтра менее выражена, чем спустя 2 нед, с такой же интенсивностью светятся структуры, похожие на эластиновые, и расположенные в склерозированной паравазальной клетчатке; в – сосуд со склерозированными оболочками и паравазальной клетчаткой. Окраска гематоксилином и эозином.*

К 4-й неделе после операции на месте имплантации коллагеновой мембраны можно было увидеть только единичные объекты, похожие на клетки, с более ярким свечением включений при установке родаминового фильтра. В большинстве таких клеточных элементов флюоресцировали также единичные очень мелкие включения, некоторые можно было обнаружить, только тщательно просматривая весь срез при большом увеличении (рис. 4а, б).

### Обсуждение

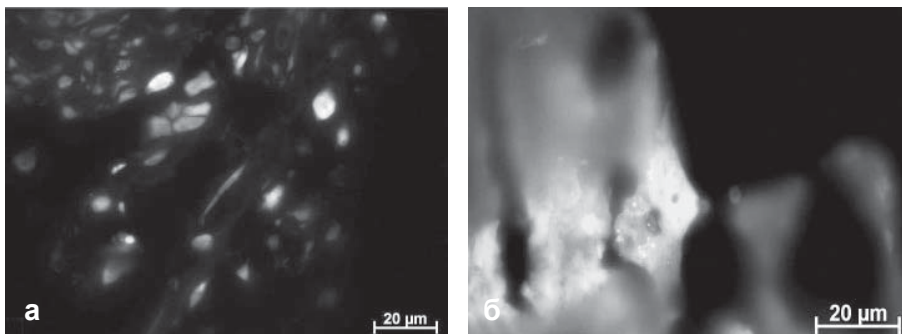
Не все АММСККП, адсорбированные на коллагеновом материале и в таком виде введенные в организм, являются жизнеспособными. Кроме того, часть их, и, видимо, значительная, погибает сразу или очень быстро при попадании в ткани из-за резких изменений условий существования [4, 5, 8, 12] и воздействия неспецифических сигналов воспаления, генерируемых в среде раны и в ответ на любое имплантированное инородное тело [4, 5].

Наиболее вероятно, что мелкие овальные объекты с четкими краями, очень интенсивно флюоресцировавшие при использовании родаминового фильтра (см. рис. 1а), являются лизосомами макрофагов, которые фагоцитировали окрашенный Vybrant® CM-Dil детрит адсорбированных на коллагене АММСККП и вследствие этого приобрели способность к свечению при воздействии ультрафиолетовым светом через родаминовый фильтр.

В таком случае более темный центр структуры, содержащей ярко светящиеся включения (см. рис. 1а), является ядром такого фагоцита.

На основании обнаружения сосудов со светящимися оболочками через 1 нед после внедрения коллагеновой мембраны с адсорбированными АММСККП (см. рис. 1б, в) можно считать подтвержденным участие введенных извне АММСККП в ангиогенезе. Все-таки часть адсорбированных на коллагеновом материале АММСККП остается жизнеспособной после имплантации и участвует в формировании молодых сосудов, которые можно обнаружить, как минимум, в течение 1 нед после операции. Отмечено повышенное выживание МСК в присутствии индуктора апоптоза FasL в условиях культивирования с компонентом внеклеточного матрикса Tenascin-C и коллагеном I типа [4].

В обычных естественных условиях ангиогенез происходит за счет собственных клеток-предшественников эндотелиоцитов. При внесении АММСККП извне и дифференцировании их в клетки-предшественники и далее в эндотелиоциты и перициты [13] ангиогенез усиливается. За счет усиления ангиогенеза вследствие участия в нем привнесенных АММСККП между коллагеновым материалом и клетчаткой, а также на периферии самого изделия сосуды формируются раньше и в большем количестве. Соответственно в большем количестве из со-



*Рис. 4.*

*К 4-й неделе после внедрения коллагенового материала с адсорбированными АММСККП в тканях содержатся редкие объекты с ярким красным свечением разных по размерам, часто единичных включений: а – клетка со свечением части цитоплазмы; б – флюоресценция очень мелких включений, расположенных в клетке.*

судов мигрируют лейкоциты и должно быстрее произойти как очищение послеоперационной раны от детрита, так и лизирование коллагеновой мембраны и замещение ее собственными тканями.

То есть доказано, что основной причиной усиления васкуляризации тканей вокруг имплантированного материала, даже не коллагеновой природы, с адсорбированными АММСККП [9, 11] является прямое участие этих клеточных элементов в ангиогенезе. Часть АММСККП погибает после имплантации в ткани и их детрит фагоцитируют макрофаги, но оставшиеся АММСККП непосредственно дифференцируются в клеточные элементы сосудистых оболочек.

Ко 2-й неделе после имплантации коллагеновой мембраны с адсорбированными АММСККП все эти клеточные элементы подверглись деструкции и их меченный Vybrant® CM-Dil дебрис находился в лизосомах макрофагов, что выглядело, как светящиеся красным или оранжевым цветом мелкие включения в крупных клеточных элементах (см. рис. 2а).

Кроме того, в эти сроки не были найдены сосуды, созданные из введенных АММСККП или с их участием, что возможно вследствие как деструкции, так и замещения клеточных элементов сосудистых оболочек, сформированных в процессе дифференцирования введенных АММСККП, собственными клетками реципиентного организма. Такое объяснение совпадает с данными о том, что максимум деструкции и фагоцитоза АММСККП у крыс приходился именно на 2–3-ю неделю после имплантации [8].

Обнаруженные на 2-й неделе после имплантации сосуды подкожно-жировой клетчатки со светящимися структурами оболочек (см. рис. 2б–е), скорее всего, появились в результате массового разрушения как самих введенных АММСККП, так и созданных из них структур. Частично детрит АММСККП, окрашенный Vybrant® CM-Dil, фагоцитируется макрофагами [8], но, видимо, часть такого дебриса и, не исключено, свободного красителя попадает в сосудистое русло и разносится по всему организму, окрашивая отдельные компоненты сосудистых оболочек, в первую очередь эндотелий.

Так как обнаружена флюоресценция и венозного, и артериального отделов сосудистого русла, можно предположить, что детрит не очень быстро элиминируется из крови, а какое-то время циркулирует по всем органам и тканям, возможно, окрашивая оболочки и отдаленных сосудов, в том числе магистральных. Также нельзя исключить, что паравазально расположенные макрофаги даже достаточно удаленных органов и тканей могут фагоцитировать окрашенный детрит АММСККП из кровеносного русла, приобретая, вследствие этого, такую же способность к флюоресценции в условиях применения родаминового фильтра, как и фагоциты рядом расположенных тканей и органов, таких как регионарные лимфатические узлы [8].

На 3-й неделе продолжают процессы разрушения АММСККП, элиминации структур, созданных с их уча-

стием, и фагоцитоза их детрита. Флюоресцирующие при установке родаминового фильтра мелкие объекты (см. рис. 3а), скорее всего, являются или окрашенным Vybrant® CM-Dil детритом АММСККП, или лизосомами макрофагов с таким дебрисом.

По-видимому, в основной массе адсорбированные на коллагеновой мембране АММСККП уже разрушены и практически весь детрит содержится в фагоцитах. В сосудистое русло поступает меньше окрашенного Vybrant® CM-Dil детрита АММСККП или самого красителя. Соответственно в меньшей степени окрашиваются сосудистые оболочки, чем объясняется уже не интенсивно красный, а оранжевый или желтый цвет эндотелия (см. рис. 3б, в). Не исключено, что детрит или краситель уже вообще не абсорбируется из тканей в просвет сосудов, а флюоресценция эндотелия медленно ослабевает за счет постепенного вымывания Vybrant® CM-Dil или его миграции, например по градиенту концентрации, из эндотелия в глубже расположенные слои сосудистой оболочки или даже еще дальше – в паравазальные ткани, также придавая им способность к характерному свечению при использовании родаминового фильтра (рис. 3б, в).

На 4-й неделе по-прежнему такими светящимися клеточными элементами на фоне применения родаминового фильтра являются макрофаги, флюоресценция которых обеспечивается лизосомами, содержащими детрит АММСККП с мембранным красителем Vybrant® CM-Dil. Постепенно уменьшается объем детрита АММСККП в оставшемся коллагеновом материале и соединительной ткани, образующейся на его месте, и, соответственно, уменьшается количество светящихся макрофагов, интенсивность их флюоресценции и количество включений–лизосом с люминесцентным материалом (см. рис. 4а, б). По-видимому, происходят как лизис окрашенного Vybrant® CM-Dil детрита, так и миграция нагруженных таким дебрисом АММСККП макрофагов в другие органы и ткани.

## Выводы

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что через 1 нед после применения коллагенового материала с адсорбированными АММСККП эти клеточные элементы формируют сосуды на периферии имплантата, дифференцируясь в клеточные элементы их оболочек. Можно считать доказанным, что основной причиной усиления васкуляризации тканей вокруг имплантатов с адсорбированными на поверхности МСК является прямое участие этих клеточных элементов в ангиогенезе через дифференцирование в клеточные элементы сосудистых оболочек.

Начиная со 2-й недели все АММСККП подвергаются деструкции и фагоцитируются макрофагами, также к этому времени исчезают структуры, построенные из этих АММСККП в результате их дифференцирования, в том числе и сосуды. Постепенно фагоциты или полностью поглощают детрит АММСККП и успешно его лизируют, или мигрируют с ним в другие органы и ткани.

**Подтверждение**

**Информация об источнике поддержки в виде грантов, оборудования, лекарственных препаратов.** Работа выполнена при финансовой поддержке ПФ-НИ 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”. Финансовой поддержки со стороны компаний–производителей оборудования, реактивов и лекарственных препаратов авторы не получали.

**Участие авторов.** Майбородин И. В. – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Хоменюк С. В. – сбор и обработка материала; Михеева Т. В. – сбор и обработка материала, анализ полученных данных; Ярин Г. Ю. – сбор и обработка материала, анализ полученных данных; Майбородина В. И. – сбор и обработка материала, анализ полученных данных, статистическая обработка; Оноприенко Н. В. – сбор и обработка материала; Вильгельми И. А. – сбор и обработка материала; Шевела А. И. – концепция и дизайн исследования, редактирование.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Одобрение комитета по этике.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

**References**

1. Aubert L, Dubus M, Rammal H, Bour C, Mongaret C, Boulagnon–Rombi C, et al. Collagen–based medical device as a stem cell carrier for regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10). pii: E2210. doi: 10.3390/ijms18102210.
2. Nguyen BB, Moriarty RA, Kamalidinov T, Etheridge JM, Fisher JP. Collagen hydrogel scaffold promotes mesenchymal stem cell and endothelial cell coculture for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(4):1123–31. doi: 10.1002/jbm.a.36008.
3. Basan T, Welly D, Kriebel K, Scholz M, Broseman A, Liese J, et al. Enhanced periodontal regeneration using collagen, stem cells or growth factors. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017;9:180–193. PMID: 27814584.
4. Rodrigues M, Yates CC, Nuschke A, Griffith L, Wells A. The matrikine Tenascin–C protects multipotential stromal cells/mesenchymal stem cells from death cytokines such as FasL. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(17–18):1972–1983. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0568.
5. Yates CC, Nuschke A, Rodrigues M, Whaley D, Dechant JJ, Taylor DP, et al. Improved transplanted stem cell survival in a polymer gel supplemented with Tenascin C accelerates healing and reduces scarring of murine skin wounds. *Cell Transplant.* 2017;26(1):103–13. doi: /10.3727/096368916X692249.
6. Maiborodin IV, Maiborodina EI, Iakimova NV, Motorina IuP, Pekarev OG. Absorbable suture material in the body. *Arkh Patol.* 2008;70(2):51–53. [In Russian].
7. Kuznetsova IV, Maiborodin IV, Shevela AI, Barannik MI, Manaev AA, Brombin AI, et al. Local tissue reaction to implantation of biodegradable suture materials. *Bull Exp Biol Med.* 2014;157(3):390–94. doi: 10.1007/s10517–014–2574–1.
8. Maiborodin IV, Morozov VV, Anikeev AA, Figurenko NF, Maslov RV, Chastikin GA, et al. Macrophage reaction to multipotent mesenchymal stromal cells introduction into surgical trauma site in rats. *Novosti Khirurgii.* 2017;25(3):233–41. doi: 10.18484/2305–0047.2017.3.233. [In Russian].
9. Maiborodin IV, Mikheeva TV, Kuzkin SA, Maiborodina VI, Kadyrova AI, Shevela AI. The some peculiarities of capsular formation after implantation of silicone with adsorbed multipotent mesenchymal stromal cells. *Molekulyarnaya meditsina.* 2019;17(2):56–64. doi: 10.29296/24999490–2019–02–08. [In Russian].
10. Krymskij LD, Nestajko GV, Rybalov AV. Raster electron microscopy of vessels and blood. Moskva: Medicina; 1976. 168 p. [In Russian].
11. Maiborodin IV, Mikheeva TV, Kuzkin SA, Kadyrova AI, Maiborodina VI, Shevela AI. 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. doi: 10.18705/2311–4495–2018–5–6–41–50. [In Russian].
12. Liu S, Jiang L, Li H, Shi H, Luo H, Zhang Y, et al. Mesenchymal stem cells prevent hypertrophic scar formation via inflammatory regulation when undergoing apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2014;134(10):2648–2657. doi: 10.1038/jid.2014.169.
13. Maiborodin IV, Yakimova NV, Matveyeva VA, Pekarev OG., Maiborodina EI, Pekareva EO. Angiogenesis in rat uterine cicatrix after injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med.* 2011;150(6):756–761. PMID: 22235436.

Надійшла 15.04.19