

На правах рукописи

ХОМЕНИЮК

Сергей Владимирович

**МОРФОЛОГИЯ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ
ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ КОЛЛАГЕНОВОГО МАТЕРИАЛА
С АДСОРБИРОВАННЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ
СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ**

3.3.2 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в лаборатории инвазивных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Заслуженный врач РФ

Шевела Андрей Иванович

Официальные оппоненты:

Летягин Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, заместитель руководителя по научной и клинической работе НИИКЭЛ – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Овсянко Елена Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анатомии человека имени академика Ю.И. Бородина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Барнаул).

Защита диссертации состоится « _____ » _____ 2023 г. в _____ час. на заседании совета 24.1.242.03 в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Клинникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Особое место среди биополимеров, используемых для создания имплантатов, занимают биodeградируемые материалы, которые разрушаются быстро и без остатков. Для практической медицины большой интерес представляют изделия из коллагена, в большой мере из-за их механической прочности и в то же время – легкости сгибания, упругости, значительной биосовместимости, полной и быстрой абсорбции (Сирак С.В. и др., 2010).

В ряде работ показана возможность инкапсуляции абсорбируемых шовных материалов, произведенных на основе коллагена, и развития гранулематозных реакций на их имплантацию (Майбородин И.В. и др., 2013, 2014; Кузнецова И.В. и др., 2014). Имеются данные, косвенно подтверждающие возможность развития некоторых нежелательных реакций на внедрение коллагеновых материалов в особых условиях (Ye Q. et al., 2010, 2011).

Мультипотентные стромальные клетки (МСК) широко применяют в регенеративной медицине после установления их значимого положительного влияния на процессы репарации (Basan T. et al., 2017). В клинических испытаниях МСК обычно вводят в виде суспензии или в сочетании с трехмерными каркасами (матрицами). Тем не менее, матрицы могут в значительной степени влиять на судьбы МСК, вызывая потерю функциональности с течением времени. Идеальная матрица должна задерживать дифференцирование МСК, пока паракринные сигналы от организма-хозяина не вызовут их изменение (Pandolfi L. et al., 2017).

Применение биоразлагаемых матриц на основе коллагена с мультипотентными клетками представляет собой новый подход к усилению регенерации тканей, который может позволить избежать многих ограничений современных методов лечения. Синтетические биоматериалы на основе коллагена могут быть эффективными каркасами для применения в регенеративной стоматологии благодаря имитации внеклеточного матрикса тканей хозяина (Samiei M. et al., 2022). Эти биоматериалы являются биосовместимыми, биоразлагаемыми, легкодоступными и нетоксичными для клеток, способность которых способствует клеточному ответу и заживлению ран в черепно-лицевой области. Коллаген может включать другие биомолекулы, чтобы вызвать минерализацию в кальцифицированных тканях, таких как кость и зуб. Кроме того, добавление этих молекул или других полимеров к биоматериалам на основе коллагена может улучшать механические свойства, что важно в областях, несущих нагрузку, таких как нижняя челюсть.

В настоящее время появилось множество инновационных биоматериалов на основе коллагена, от гемостатических коллагеновых губок до регенеративных каркасов костей/тканей и инъекционных коллагеновых матриц для генной или клеточной регенеративной терапии (Binlath T. et al., 2022). Существуют разные источники коллагена – от животного до морского происхождения, а также растительных экстрактов рекомбинантного человеческого коллагена I типа (rhCOL1).

Коллагеновые матрицы или скаффолды очень часто используют для доставки МСК в организм. Практически во всех публикациях, посвященных использованию коллагена в качестве матриц для МСК, отмечается хорошее взаимодействие между биополимером, клетками и организмом (Rodrigues M. et al., 2013; Aubert L. et al., 2017; Nguyen B.V. et al., 2017; Yates C.C. et al., 2017; Basan T. et al., 2017). Следует отметить, что имплантация МСК для реконструкции тканей приводит к быстрой гибели этих клеток, поскольку на них воздействуют неспецифические сигналы воспаления, генерируемые в ранах, в том числе в ответ на любое имплантированное инородное тело (Rodrigues M. et al., 2013; Yates C.C. et al., 2017). МСК, выращенные на компоненте внеклеточного матрикса Tenascin-C и коллагене I типа, показали преимущество в выживаемости в присутствии FasL (трансмембранного протеина, связывание которого с рецептором, индуцирует апоптоз) (Rodrigues M. et al., 2013).

Изделия низкой жесткости на основе коллагена I типа (гемостатическая пена) применяют в качестве миметической ниши для МСК человека с целью сохранения стволовой структуры *in vitro*. Инертная микросреда пены на основе коллагена позволила 80% культивировать

емых МСК оставаться жизнеспособными. В таком трехмерном окружении МСК приобретали уплощенную морфологию и сохраняли недифференцированное состояние с базальной секреторной активностью (Aubert L. et al., 2017). При оценке регенеративного потенциала различных коллагеновых матриц для стволовых клеток было установлено значительное усиление регенерации периодонтальной связки, восстановление адгезии достигало 77% против 13% в контрольной группе (Basan T. et al., 2017). В то же время показано, что матрицы с МСК могут вызывать более выраженный воспалительный ответ, ангиогенез и области раннего формирования кости по сравнению с матрицами без клеток (Alhag M. et al., 2011).

Степень разработанности темы исследования. За последнее десятилетие в области биоматериалов на основе коллагена появилось множество инноваций. Были разработаны и усовершенствованы гемостатические коллагеновые губки, костно-тканевые регенеративные каркасы и инъекционные коллагеновые матрицы для генной или клеточной регенеративной терапии (Domingues J.A. et al., 2016; Mansouri V. et al., 2017). В подавляющем большинстве публикаций, посвященных использованию коллагена в качестве матриц для МСК, отмечается хорошее взаимодействие между биополимером, клетками и организмом, за исключением некоторых случаев развития нежелательных реакций (Майбородин И.В. и др., 2019; Nguyen B.V. et al., 2017; Huang Y. et al., 2022). Вместе с тем явно недостаточно данных о влиянии самих МСК на процессы взаимодействия коллагеновых материалов с живым организмом. Имеются противоречивые данные о деградации коллагена с развитием реакций на инородное тело. Отсутствие понимания динамики и выраженности таких процессов не позволяет оценивать сроки полного лизиса подобных материалов, разрабатывать эффективные методы профилактики и лечения возможных осложнений.

Цель исследования: изучить особенности регенераторных процессов после имплантации коллагеновых мембран с адсорбированными аутологичными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костномозгового происхождения в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Методами световой микроскопии с применением иммуногистохимии изучить характер регенераторных реакций и процессы деградации коллагенового материала, имплантированного в подкожную клетчатку крыс.

2. Установить особенности регенерации тканей и деструкции имплантированной коллагеновой мембраны с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения.

3. С использованием люминесцентных методов микроскопии установить судьбу введенных в подкожную клетчатку аутологичных МСК костномозгового происхождения, адсорбированных на коллагеновой мембране.

4. На основании применения морфометрии определить динамику клеточных реакций на внедрение коллагеновой матрицы с и без адсорбированных аутологичных МСК костномозгового происхождения.

Научная новизна исследования. Впервые установлено, что к особенностям регенераторных процессов при применении коллагеновой мембраны с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения относятся усиление васкуляризации, в том числе и за счет формирования сосудов с участием введенных клеток, и клеточной инфльтрации. Совокупность этих факторов приводит к ускоренной деградации всего имплантированного коллагена, включая и его более плотные участки. Лимфангиогенез с участием введенных аутологичных МСК костномозгового происхождения обуславливает более эффективное удаление продуктов гидролиза и лизиса имплантированного коллагена, что также создает условия для его более быстрого и полного разрушения.

Впервые установлено, что в течение 2 – 3 нед у крыс все аутологичные МСК костномозгового происхождения, адсорбированные на коллагеновой мембране, разрушаются и фагоцитируются макрофагами, также в этот промежуток времени исчезают структуры, образованные из этих клеток в результате дифференцировки МСК.

Впервые обнаружено, что гранулемы инородного тела в подкожной клетчатке крыс после имплантации коллагенового изделия с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения образуются на 1 нед раньше, чем после внедрения чистого коллагена. На одну неделю раньше (к 4-й неделе) происходит полная деструкция всей коллагеновой матрицы вместе с более плотными участками.

Теоретическое и практическое значение работы. Получены новые знания об особенностях тканевых реакций на имплантацию коллагеновых материалов с адсорбированными на поверхности аутологичными МСК костномозгового происхождения. В связи с тем, что в ответ на присутствие в тканях плотных, медленно лизируемых компонентов коллагеновой мембраны возможно развитие гранулематозного воспаления, для внедрения в организм следует выбирать наиболее однородные коллагеновые материалы, без отличающихся по плотности участков.

В связи с обнаруженным усилением васкуляризации с участием введенных аутологичных МСК костномозгового происхождения, их последующей элиминацией из стенок сосудов и возрастанием содержания эритроцитов в тканях, являются целесообразными разработка и проведение мероприятий, направленных на стабилизацию и уменьшение проницаемости сосудистой стенки при процедурах имплантации в условиях использованной клеточной технологии. В работе показано, что для идентификации, обнаружения и изучения эластиновых структур сосудистых оболочек и, возможно, эндотелиальной выстилки, целесообразно применять флюоресцентный краситель Vybrant-CM-Dil, встроенный в мембраны адсорбированных аутологичных МСК костномозгового происхождения.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на применении принципов и методов комплексного морфологического анализа (световая и люминесцентная микроскопия, иммуногистохимия, морфометрический анализ) реорганизации и регенерации тканей после имплантации полимера биологического происхождения и применения клеточных технологий для воздействия на процессы деградации такого материала, общих подходах к экспериментальному моделированию, созданию новых маркеров иммуно-, гисто- и цитохимии. Объект исследований – образцы тканей крыс после имплантации коллагенового материала и использования аутологичных МСК костномозгового происхождения. Предмет исследования – особенности регенерации тканей с оценкой характера деградации имплантированного инородного коллагена в условиях применения аутологичных МСК костномозгового происхождения.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. К особенностям регенераторных реакций при применении коллагеновой мембраны с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения относятся усиление васкуляризации и клеточной инфильтрации.

2. Гранулемы инородного тела после имплантации коллагенового изделия с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения у крыс образуются на одну неделю раньше, чем после внедрения чистого коллагена. На одну неделю раньше происходит полная деструкция коллагенового материала вместе с более плотными участками.

3. В течение 2 – 3 нед все аутологичные МСК костномозгового происхождения, введенные в ткани вместе с коллагеновой мембраной, разрушаются и фагоцитируются макрофагами.

4. После полного лизиса коллагеновой матрицы выраженность воспаления резко снижается, значительно уменьшаются количественные показатели васкуляризации (в 2,6 раза) и клеточной инфильтраций (в 2,7 раза) окружающих тканей.

Степень достоверности и апробация результатов. Использованные методы исследования (световая и люминесцентная микроскопия, иммуногистохимия, морфометрический анализ), имплантации коллагенового материала и применения клеточных технологий с использованием современного сертифицированного оборудования, адекватная статистическая обработка количественных данных соответствуют поставленным цели и задачам,

позволяют получить достоверные результаты и сделать обоснованные выводы. Диссертация выполнена на достаточном экспериментальном материале (использовано 96 самцов инбредных линейных крыс Wag, которым подкожно внедряли фрагменты коллагеновой мембраны без и с адсорбированными на поверхности аутологичными МСК костномозгового происхождения). Сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах собственных исследований, не носят характера умозрительных заключений и вытекают из результатов работы.

Апробация работы. Результаты проведенного исследования докладывались и обсуждались на XIV Международной научно-практической конференции «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (Новосибирск, 2021), VI съезде Российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022) и заседании научного персонала лабораторий технологий управления здоровьем, инвазивных медицинских технологий, персонализированной медицины и геномных медицинских технологий ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (Новосибирск, 2023).

Исследование поддержано Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2017-2020 гг. (VI.62.2.1, 0309-2016-0006) «Разработка технологий получения материалов для регенеративной медицины и развитие методов восстановления репродуктивного здоровья» и Программой фундаментальных исследований РАН по приоритетному направлению I.30П (ФИМТ-254, 0309-2015-0017) «Разработка новых клеточных технологий коррекции венозных тромботических процессов, основанных на введении мезенхимальных стромальных клеток в участок формирования тромба».

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 7 работ, из них 2 – в научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 123 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов с их обсуждением, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы, включающего 148 источников (51 отечественный и 97 иностранных). Работа иллюстрирована 8 таблицами и 21 многокомпонентным комбинированным рисунком.

Личный вклад автора. Автором проведены планирование и разработка дизайна исследования, сформулированы его цель и задачи, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретированы и опубликованы основные результаты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа основана на результатах морфологического исследования тканей вокруг коллагеновой мембраны, имплантированной после пассивной адсорбции на поверхности аутологичных МСК костномозгового происхождения, подкожно крысам-самцам инбредной линии Wag. Эксперименты проводили на животных массой 180 – 200 г в возраст 6 мес. Крысы содержались в виварии Института цитологии и генетики СО РАН, соответствующем категории SPF. Животных содержали при естественном освещении и неограниченном доступе к корму и воде. Все манипуляции не были связаны с причинением крысам боли и проведены под общей ингаляционной эфирной анестезии в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г.; Приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13 ноября 1984 г.). Хирургическое вмешательство по имплантации коллагена, свя-

занное с повреждением тканей, было выполнено в условиях чистой операционной с соблюдением правил асептики и антисептики.

Клетки костного мозга, полученные из бедренных костей крыс-самцов инбредной линии Wag (биооптирование под эфирной анестезией) после суспендирования помещали в пластиковые сосуды («Nunk», Дания), через 2 сут адгезированные к пластику клетки культивировали в среде α -MEM, дополненной эмбриональной телячьей сывороткой (10%-ный раствор) («Biolot», Россия) и 2 mM раствором глутамакса. Процесс проходил в CO₂-инкубаторе при температуре при 37°C, насыщенной влажности, 5% CO₂. В эксперименте использовали клетки 2 – 3-го пассажей; клетки оставались фибробластоподобными и имели поверхностные антигены CD34-, CD45-, CD90+, CD105+. Использовали подробный протокол трансфекции и способы оценки экспрессии введенного гена GFP в МСК, как описано ранее (Майбородин И.В. и др., 2010, 2012). Мембраны МСК после трансфекции белка GFP дополнительно окрашивали раствором Vybrant® CM-Dil (Thermo Fisher Scientific, USA) (Майбородин И.В. и др., 2017). В качестве коллагенового материала использовали стерильные мембраны «Коллост» 60x50x1,5 мм (ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ», Россия). Непосредственно перед операцией фрагменты коллагенового изделия размером 5x5 мм погружали в суспензию МСК на 2 ч для пассивной адсорбции, в связи с тем, что живые клетки, как и клетки перевиваемых клеточных культур, из взвеси прикрепляются практически к любому твердому субстрату (Шевела А.А. и др., 2017).

Для подкожной имплантации коллагена производили разрез кожи по средней линии спины в области шеи от основания черепа до лопаток длиной 1 – 2 см. Тупым способом (сомкнутыми браншами зажима) формировали слепой канал длиной 1,5 – 2 см в сторону правой лопатки. В данный карман помещали фрагмент Коллоста с или без адсорбированных МСК. Послеоперационные раны ушивали непрерывными швами. Воспалительных осложнений в месте послеоперационных швов не было обнаружено ни у одного животного. Крыс декапитировали через 1; 2; 3 и 4 нед после имплантации коллагенового материала. В каждой группе было 12 животных. Всего было использовано 96 крыс.

Образцы тканей с Коллостом фиксировали в 4% забуференном параформальдегиде (рН 7,4) не менее 1 сут, обезвоживали и просветляли в реактиве «Изопреп» (БиоВитрум, Россия) и заключали в гистопласт. Гистологические срезы толщиной 5 – 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по ван Гизону (Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996). С целью оценки количества и распределения макрофагов на срезах проводили непрямую иммунопероксидазную реакцию с моноклональными антителами против CD68-антигена, в соответствии с рекомендациями производителя антител (Dako, Дания). Гистологические срезы исследовали при увеличении до 1200 раз в световом микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Germany). Кроме того, неокрашенные срезы исследовали в режиме люминесценции указанного микроскопа с фильтрами Alexa Fluor 488 или для родамина.

Для оценки объемных плотностей структур и цитограммы проводили измерения изображений, полученных при помощи цифровой видеокамеры микроскопа, на экране компьютера с использованием программного обеспечения морфологического модуля Axiovision (Zeiss, Германия). В течение 1-й недели после имплантации клетки и сосуды были найдены в основном на периферии Коллоста. Так как биодеградация Коллоста начинается по его границам, отдельно изучали периферию материала (до 0,5 мм от края) и его центр. Только через 2 нед единичные клетки и сосуды появлялись в центральных областях коллагеновой мембраны. В связи с этим изучение васкуляризации и клеточной инфильтрации центральных частей имплантированного Коллоста было проведено начиная со 2-й недели.

Статистическую обработку полученных данных проводили на прикладной статистической программе MS Excel 7.0 (Microsoft, USA), определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверность различия сравниваемых средних величин оценивали на основании критерия Стьюдента для заданного порога (p) вероятности безошибочных прогнозов (Плохинский Н.А., 1970). Достоверным считали различие между сравниваемыми

мыми рядами с уровнем доверительной вероятности 95% и выше. При расчетах учитывали, что распределение исследуемых признаков было близким к нормальному.

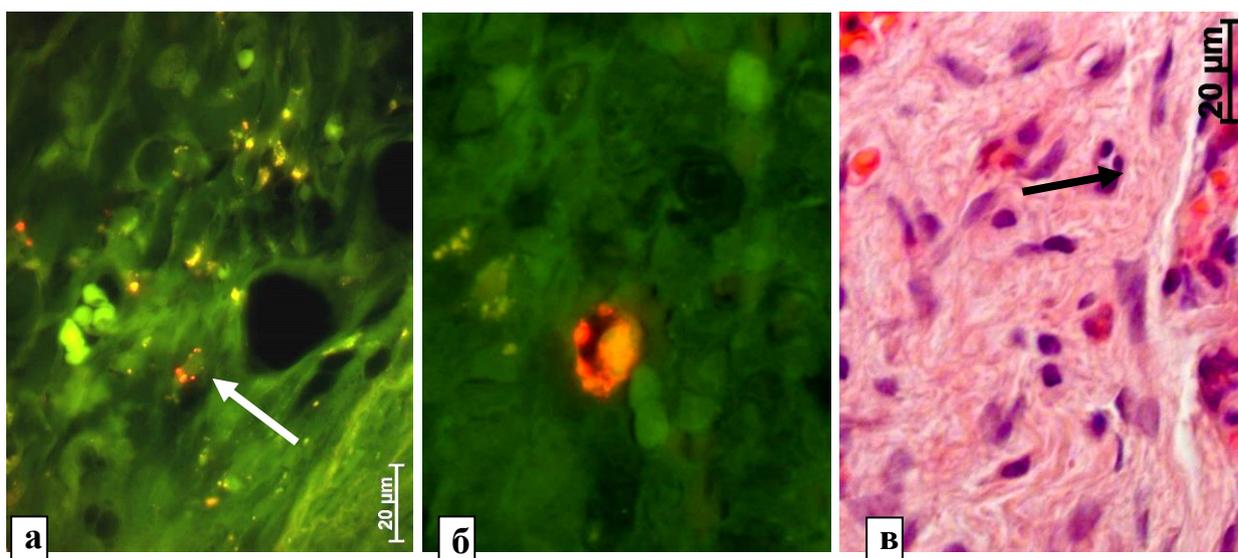
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология биодеградационной коллагеновой мембраны с адсорбированными мультипотентными стромальными клетками после имплантации. Спустя 1 нед после имплантации Коллоста в тканях под кожей присутствовал практически гомогенный эозинофильный бесструктурный материал, легко отделяющийся от подкожно-жировой клетчатки. Иногда это коллагеновое изделие было частично разволокнено. По границам материал был окружен тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани. На периферии в Коллосте уже наблюдались диффузная инфильтрация крупными клетками и небольшие тонкостенные сосуды с оболочкой из одного слоя клеток. Другие авторы также отмечают активный ангиогенез в области тканевого дефекта после заполнения его Коллостом (Сирак С.В. и др., 2010).

В качестве отличий, обусловленных адсорбцией МСК, необходимо отметить визуально значительно более выраженную васкуляризацию периферии Коллоста, причем, часто молодые сосуды с широким просветом и тонкими стенками были расположены обширными группами. Возможно, что в условиях тканевой гипоксии происходит стимуляция дифференцирования адсорбированных на коллагене МСК в направлении клеточных элементов сосудистых оболочек: эндотелиоцитов и перицитов (Martin-Rendon E. et al., 2007; Hu X. et al., 2008; Лыков А.П. и др., 2015), что способствует усилению васкуляризации именно краев материала, там, где были расположены МСК. Кроме того, МСК продуцируют большой объем VEGF и других проангиогенных факторов (Prichard H.L. et al., 2008; Patel J. et al., 2010; Han D. et al., 2011; Nguyen B.V. et al., 2017) и таким образом также стимулируется рост сосудов на периферию собственно коллагенового материала.

При изучении неокрашенных срезов с использованием люминесценции рядом с Коллостом было найдено множество мелких овальных объектов с четкими краями. Эти структуры очень ярко светились при установке родаминового фильтра, и иногда было заметно расположение таких светящихся объектов на периферии более темной структуры (рисунок, а). Наиболее вероятно, что такие флуоресцирующие объекты являются лизосомами макрофагов, которые фагоцитировали окрашенный Vybrant-CM-Dil детрит адсорбированных на коллагене МСК. Необходимо обратить внимание, что иногда на периферии Коллоста были найдены типичные очень мелкие сосуды с однослойной оболочкой, которая очень интенсивно флуоресцировала при использовании фильтра для родамина (рисунок, б, в). Таким образом, можно еще раз считать подтвержденным непосредственное участие введенных извне МСК в ангиогенезе.

В естественных условиях ангиогенез идет за счет собственных клеток-предшественников эндотелиоцитов. При введении аутологичных МСК костномозгового происхождения и дифференцировки их в клетки-предшественники и далее в эндотелиоциты и перициты, ангиогенез ускоряется. За счет усиления ангиогенеза вследствие участия в нем привнесенных аутологичных МСК костномозгового происхождения между Коллостом и клетчаткой, а также на периферии самого полимера сосуды формируются раньше, и их образуется больше. Соответственно, в большем количестве из сосудов мигрируют лейкоциты и быстрее происходит как очищение раны от детрита, так и лизирование Коллоста и замещение его собственными тканями. То есть основной причиной усиления васкуляризации тканей вокруг имплантированного материала с адсорбированными МСК костномозгового происхождения является прямое участие этих клеток в ангиогенезе. Часть аутологичных МСК костномозгового происхождения погибает при имплантации в ткани; их детрит фагоцитируют макрофаги, но оставшиеся МСК непосредственно дифференцируются в клетки сосудистых оболочек.



Край коллагенового материала через 1 нед после имплантации с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения.

а – отдельные клеточные элементы с темным центром содержат множество мелких овальных включений с четкими краями и очень ярким свечением при установке родаминового фильтра (стрелка); б - сосуд со сформированным просветом и тонкой однослойной стенкой из ярко светящихся при установке родаминового фильтра клеток; в – мелкий сосуд с пустым просветом и однослойной оболочкой (стрелка), ядра эндотелиоцитов выступают в просвет сосуда. а, б – компьютерное совмещение изображений, полученных с неокрашенного среза в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa 488 и для родамина; в – окраска гематоксилином и эозином.

Через 2 нед наблюдалась фрагментация Коллоста. Из имплантированной мембраны были сформированы крупные депозиты коллагена разной плотности и с разной интенсивностью окрашивающиеся эозином. Между такими депозитами проходили тяжи с клеточными элементами и кровеносными сосудами, последние часто располагались группами. Общим практически для всех наблюдений было обнаружение обширных псевдокист с оптически прозрачным содержимым.

По-видимому, более плотные участки коллагена, которые более интенсивно окрашивались эозином и не содержали или содержали очень мало клеток, связаны с изначально неоднородным по плотности или количеству поперечных шивок полимером. Отмечены случаи отграничения более плотных фрагментов Коллоста от окружающего материала имплантата (Сирак С.В. и др., 2010). Скорость деструкции коллагеновых материалов зависит, по данным литературы (Dunn M.G. et al., 1993; Ma X.H. et al., 1996; Ye Q. et al., 2010a, 2010b), от выраженности поперечных связей между волокнами: те участки, где таких шивок много, более устойчивы к лизису ферментами фагоцитов и, соответственно, в них медленнее мигрируют лейкоциты, медленнее прорастают сосуды, такие депозиты дольше остаются нелизированными.

Визуально результатом адсорбции аутологичных МСК костномозгового происхождения на Коллосте по-прежнему было более высокое число сосудов. Кроме этого, можно отметить большую степень деградации полимера, в том числе и его более плотных депозитов. Также необходимо обратить внимание на инфильтрацию плотных депозитов коллагенового материала макрофагами и формирование из них многоядерных клеток и гранул инородного тела. Не исключено, что для образования соединительнотканых компонентов этих гранул используется материал коллагенового имплантата. Необходимо отметить, что разрушаясь, МСК сами по себе стимулируют миграцию иммунокомпетентных клеток к своему дебрису в силу определенной его антигенности (Badillo A.T. et al., 2007; Camp D.M. et al., 2009; Zangi L. et al., 2009). Лейкоциты фагоцитируют и лизируют не только детрит МСК, но и коллагеновую матрицу, на которой эти клеточные элементы были внесены в организм.

При изучении неокрашенных срезов методами световой микроскопии с использованием люминесценции через 2 нед не найдено на периферии Коллоста и рядом с имплантатом четко дифференцируемых структур, построенных из клеток с преимущественной флюоресценцией при установке родаминового фильтра. На таких участках красным цветом светились только мелкие включения в отдельных клетках. Скорее всего, такие объекты были макрофагами с флюоресцирующими лизосомами за счет содержания в них детрита аутологичных МСК костномозгового происхождения, окрашенных мембранным красителем Vybrant-CM-Dil. То есть, ко 2-й неделе после имплантации Коллоста с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения все эти клетки подверглись деструкции, и их детрит находился в лизосомах макрофагов. Кроме того, были разрушены все сосуды, созданные из введенных аутологичных МСК костномозгового происхождения или с их участием, но здесь возможно замещение клеток сосудистых оболочек, созданных в процессе дифференцировки введенных аутологичных МСК костномозгового происхождения, собственными клетками организма-реципиента.

Через 3 нед усиливались клеточная инфильтрация и васкуляризация деградирующих участков Коллоста, тогда как на бесклеточных депозитах стало заметно разволокнение полимера: его волокна отходили друг от друга. Образования капсулы вокруг коллагеновой мембраны отмечено не было, но в подвергающихся деструкции частях имплантата присутствовали разные по размерам гранулемы инородных тел, иногда в них можно было отметить более плотные эозинофильные частицы коллагена. Псевдокисты в этот срок уже не выявлены ни в одном наблюдении.

После внедрения Коллоста с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения было найдено, что оставшиеся фрагменты коллагенового материала значительно меньше по размерам, в них практически отсутствуют более плотные бесклеточные депозиты коллагена. Оставшиеся фрагменты имплантата более-менее равномерно инфильтрированы клеточными элементами и васкуляризированы. В некоторых случаях такие фрагменты похожи на плотную волокнистую соединительную ткань, фактически рубец, сформированный на месте хирургического разреза.

На неокрашенных срезах в условиях флюоресцентной микроскопии в данный срок уже четко нельзя было разграничить периферию Коллоста и окружающие ткани. На отдельных местах находилось очень много мелких частиц с интенсивной люминесценцией при использовании фильтра для родамина. Наиболее вероятно, что флюоресцирующие при установке родаминового фильтра мелкие объекты были или окрашенным Vybrant-CM-Dil детритом аутологичных МСК костномозгового происхождения, или лизосомами макрофагов с таким детритом.

Через 4 нед после операции на месте Коллоста в подкожно-жировой клетчатке присутствовали обширные разрастания плотной волокнистой соединительной ткани. Объем такой ткани был намного меньше, чем объем имплантированного материала. Васкуляризация и клеточная инфильтрация, по сравнению с прошлыми сроками, значительно уменьшились. Но в этой плотной волокнистой соединительной ткани по-прежнему содержались небольшие гранулемы, состоящие из гигантских клеток инородных тел и мелких фрагментов нелизируемого чужеродного материала.

После внедрения коллагена с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения все место Коллоста занимала плотная волокнистая соединительная ткань, в ней присутствовали небольшие гранулемы, но бесклеточные гомогенные эозинофильные структуры не найдены. Визуально в молодой соединительной ткани по сравнению с прошлым сроком и с результатами имплантации Коллоста без МСК, стала намного менее выраженной клеточная инфильтрация, в том числе и макрофагальная. Основное место в цитограмме клеточных элементов занимали фибробласты и лимфоциты.

Усиление васкуляризации, приводящее к более интенсивной клеточной инфильтрации, отмеченные на прошлые даты эксперимента, как эффекты влияния МСК, по-види-

тому, способствовали более активному воздействию на коллагеновую мембрану ферментов фагоцитов, дополнительно привлеченных детритом адсорбированных МСК (Майбородин И.В. и др., 2014, 2016, 2017), что в результате ускорило лизис инородного коллагена.

Морфометрические показатели изучения влияния мультипотентных стромальных клеток на деградацию периферической части имплантированного коллагена. После имплантации Коллоста без аутологичных МСК костномозгового происхождения объемная плотность кровеносных сосудов на периферии материала через 3 и 4 нед после операции стала больше в 2,1 раза, чем через 1 нед (табл. 1). Объемная плотность лимфатических сосудов спустя 2, 3 и 4 нед после имплантации возрасла в 9,1; 13,2 и 10,8 раза, соответственно, относительно 1-й недели. Через 3 нед этот показатель был выше на 44,6%, чем через 2 нед (см. табл. 1).

Таблица 1 – Структурная организация периферии имплантированной коллагеновой мембраны (S±σ)

Параметр	Срок после имплантации			
	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед
1	2	3	4	5
Имплантация без МСК				
Кровеносные капилляры (A _A)	3,47±1,06 ^{4,5}	5,53±0,915	7,2±0,941 ²	7,27±0,961 ²
Лимфатические капилляры (A _A)	1±1,36 ^{3,4,5}	9,13±0,915 ^{2,4}	13,2±1,08 ^{2,3}	10,8±1,15 ²
Интерстициальные пространства (A _A)	1,33±1,59 ^{3,4,5}	12,4±1,45 ²	12,5±1,13 ²	12,4±1,24 ²
Клеточные элементы (A _A)	4,33±0,724 ^{4,5}	5,33±1,05 ^{4,5}	16,4±1,84 ^{2,3}	12,2±1,01 ^{2,3}
Коллост и межклеточный матрикс (A _A)	89,9±2,5 ^{3,4,5}	67,6±2,23 ^{2,4,5}	50,7±2,87 ^{2,3}	57,3±1,84 ^{2,3}
Имплантация с применением МСК				
Кровеносные капилляры (A _A)	11,7±1,68 ^{5*}	9,6±1,18 ^{5*}	7,8±1,42 ⁵	2,8±0,862 ^{2,3,4*}
Лимфатические капилляры (A _A)	4,47±0,99 ^{3,4*}	9,07±1,16 ^{2,5}	9,8±1,66 ^{2,5}	2,8±0,775 ^{3,4*}
Интерстициальные пространства (A _A)	2,53±0,516 ^{3,4,5}	7,8±0,561 ^{2,5*}	6,8±0,775 ^{2*}	5,53±0,915 ^{2,3*}
Клеточные элементы (A _A)	7,4±0,828 ^{4,5*}	8,73±0,704 ^{4*}	14,7±1,98 ^{2,3}	10,9±1,16 ²
Коллост и межклеточный матрикс (A _A)	73,9±1,75 ^{3,4*}	64,8±1,32 ^{2,5}	60,9±2,7 ^{2,5*}	77,9±1,58 ^{3,4*}

Примечание: A_A – относительная площадь структур на срезе (%); ^{2,3,4,5} – величины, достоверно различающиеся между собой в данных колонках (p<0,05); * – величины, достоверно отличающиеся от соответствующих у животных после имплантации без МСК (p<0,05).

Объемная плотность интерстициальных пространств через 2, 3 и 4 нед после операции возросла в 9,3; 9,4 и 9,3 раза, соответственно, по сравнению с 1-й неделей (см. табл. 1). Относительная площадь клеточных элементов через 3 и 4 нед после операции стала больше в 3,8 и 2,8 раза, соответственно, чем через 1 нед и в 3,1 и 2,3 раза по сравнению со 2-й неделей (см. табл. 1). Объемная плотность оставшегося Коллоста и вновь синтезированного межклеточного матрикса спустя 1 нед после имплантации без аутологичных МСК костномозгового происхождения была статистически значимо больше на 33%; 77,3% и 56,9%, соответственно, чем через 2, 3 и 4 нед. При этом через 2 нед этот показатель был выше на 33,3% и 18%, соответственно, относительно 3-й и 4-й недель (см. табл. 1).

После имплантации Коллоста с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения объемная плотность кровеносных сосудов по периферии материала была минимальной через 4 нед: уменьшение в 4,2; 3,4 и 2,8 раза, соответственно, по сравнению с данными через 1, 2 и 3 нед (см. табл. 1). Объемная плотность лимфатических сосудов спустя 2 нед после имплантации была выше в 2 и 3,2 раза, соответственно, относительно 1-й и 4-й недель. К 3-й неделе этот показатель был больше соответственно в 2,2 и 3,5 раза,

относительно 1-й и 4-й недель (см. табл. 1). Объемная плотность лимфатических сосудов через 4 нед была меньше в 3,9 раза по сравнению с имплантацией Коллоста без использования МСК (см. табл. 1).

Объемная плотность интерстициальных пространств через 2, 3 и 4 нед после операции возросла в 3,1; 2,7 и 2,2 раза, соответственно, по сравнению с 1-й неделей. Через 4 нед данный показатель уменьшался на 41% по сравнению со 2-й неделей (см. табл. 1). При сравнении с данными без применения МСК объемная плотность интерстициальных пространств была увеличена через 2, 3 и 4 нед соответственно на 59%; 83,8% и в 2,2 раза.

Объемная плотность клеточных элементов через 3 и 4 нед после операции стала больше на 98,6% и 47,3%, соответственно, чем на 1-й неделе. При этом к 3-й неделе данный показатель уменьшался на 68,4% по сравнению со 2-й неделей (см. табл. 1).

Объемная плотность нелизированного Коллоста и вновь синтезированного межклеточного матрикса спустя 1 нед после имплантации мембраны с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения была достоверно больше на 14% и 21,3%, соответственно, чем через 2 и 3 нед. При этом на 4-й неделе данный показатель возрос на 20,2% и 27,9%, соответственно, относительно 2-й и 3-й недель (см. табл. 1).

В качестве результатов применения клеточных технологий можно отметить, что объемная плотность кровеносных сосудов через 1 и 2 нед после имплантации Коллоста с адсорбированными МСК была больше в 3,4 раза и на 73,6%, соответственно, а через 4 нед, наоборот, меньше в 2,6 раза, чем после внедрения Коллоста без МСК. Объемная плотность лимфатических сосудов через 1 нед после операции была больше в 4,5 раза, а через 4 нед – меньше в 3,9 раза, по сравнению с имплантацией Коллоста без использования клеточных технологий (см. табл. 1).

Согласно литературным данным, трансплантация МСК в ткани после операции приводит к их дифференцировке в клетки сосудистых оболочек (Майбородин И.В. и др., 2013, 2015) и увеличению численности сосудов грануляционной ткани. По-видимому, за счет этого быстро нарастает васкуляризация периферии Коллоста, что способствует миграции в Коллост клеток и более быстрой его деградации. По мере разрушения коллагеновой мембраны, более быстрого, чем при естественном процессе, воспаление, вызванное наличием инородного тела в тканях, затихает, и там резко снижается васкуляризация. МСК могут дифференцироваться и в клеточные элементы оболочек лимфатических сосудов (Майбородин И.В. и др., 2015), но образование компонентов лимфатического русла из МСК или начинается позже или проходит медленнее (Майбородин И.В. и др., 2015), вследствие этого усиление лимфатической васкуляризации отмечено позже кровеносной на неделю.

На фоне внедрения Коллоста без МСК численная плотность всех клеток на периферии материала через 2, 3 и 4 нед после операции возрастала на 67,3%; в 2,5 и 2,7 раза, соответственно, чем через 1 нед.

Такое постоянное нарастание клеточной инфильтрации краев имплантированного материала, по всей вероятности, свидетельствует как об усиливающихся процессах его деградации, так и о возрастающей интенсивности асептического воспаления, сопровождающего присутствие инородного материала в тканях.

Процентное содержание лимфоцитов спустя 3 нед после имплантации уменьшилось на 65,6% и 47,4%, соответственно, относительно 1-й и 2-й недель. Абсолютное количество лимфоцитов к 4-й неделе после операции возросло в 2,3 раза по сравнению с 1-й неделей. Относительное содержание нейтрофилов через 3 нед после операции уменьшилось в 2,2 раза и на 70,2%, соответственно, по сравнению с 1-й и 2-й неделями. К 4-й неделе данный показатель уменьшался в 2,6 раза и на 98,3% по сравнению с данными через 1 и 2 нед.

Уменьшение процентного содержания лимфоцитов и нейтрофилов при нарастании численной плотности лимфоцитов указывает на то, что воспалительная реакция вокруг Коллоста, в том числе и на периферии, обусловлена не присоединением инфекции (тогда преобладали бы нейтрофильные лейкоциты, и их содержание было бы постоянно высоким).

Воспаление является асептическим и поддерживается присутствием инородного коллагенового материала в тканях организма. Спустя 3 и 4 нед в деградирующем Коллосте среди инфильтрирующих его клеток появлялись тканевые базофилы (тучные клетки).

Численная плотность эритроцитов через 3 нед после имплантации Коллоста без аутологичных МСК костномозгового происхождения возрастала в 7,1 раза по сравнению с данными через 1 нед. Следует отметить, что именно к этому сроку были обнаружены максимально выраженные процессы дегенерации Коллоста, которые сопровождались активным воспалением. Стаз эритроцитов в сосудах и их тромбоз служат основной причиной диapedеза форменных элементов крови и появления их в большом количестве в тканях.

Абсолютное количество моноцитов спустя 4 нед после операции возросло в 2,6 раза, относительно 1-й недели. Относительное содержание макрофагов через 1 нед было меньше на 54,7%; в 2,5 раза и на 66%, соответственно, по сравнению со 2- 3- и 4-й неделями. К 3-й неделе этот показатель был выше на 63,8% и 52,7%, соответственно, по сравнению с данными через 2 и 4 нед. Число макрофагов в единице площади среза через 2, 3 и 4 нед после операции возросло в 2,6; 6,3 и 4,5 раза, соответственно, относительно 1-й недели.

Начиная со 2-й недели в Коллосте появлялись гигантские клетки инородных тел. И если через 2 нед эти клетки были обнаружены в единичных наблюдениях, то через 3 и 4 нед многоядерные макрофаги со слившейся цитоплазмой присутствовали во всех срезах, особенно часто эти клетки были расположены рядом с более плотными коллагеновыми депозитами.

Численная плотность клеток с признаками деструкции через 3 нед стала больше в 4,4 и 2,7 раза, соответственно, по сравнению с 1-й и 2-й неделями. При этом к 4-й неделе этот показатель возрос в 4,6 и 2,8 раза, соответственно, по сравнению с данными через 1 и 2 нед. Клетками с деструктивными изменениями ядра (кариопикноз, криорексис, кариолизис) и цитоплазмы (выраженная вакуолизация) чаще всего были лейкоциты, поглотившие много антигенных или токсических веществ или подвергшиеся действию лизосомальных ферментов, экзоцитируемых другими иммунокомпетентными клетками (Кузин М.И., Костюченко Б.М., 1990; Fredriksson M.I. et al., 2003). То есть высокое содержание на периферии Коллоста клеток с признаками деструкции отражает как активные процессы его дегенерации, так и высокую активность асептического воспаления, сопровождающего саму имплантацию, присутствие в тканях и разрушение инородного тела.

После имплантации коллагеновой мембраны с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения численная плотность всех клеток на периферии материала через 4 нед после операции стала меньше на 67,9%; в 2,7 и 2,9 раза, соответственно, чем через 1, 2 и 3 нед. Ко 2-й и 3-й неделям этот показатель увеличился на 59,8% и 72,5%, соответственно, по сравнению с 1-й неделей.

Процентное содержание лимфоцитов спустя 3 нед после имплантации было меньше на 56,6% и 85,9%, соответственно, относительно 1-й и 4-й недель; к 4-й неделе стал больше на 35,5%, по сравнению со 2-й неделей. Относительное содержание нейтрофилов через 3 нед уменьшилось на 98,1% и 88,7%, соответственно, по сравнению с 1-й и 2-й неделями. К 4-й неделе этот показатель уменьшился в 2,1 раза и на 96,3%, соответственно, по сравнению с 1-й и 2-й неделями. Абсолютное количество нейтрофилов к 4-й неделе после операции снизилось в 3,5; 5,3 и 3 раза, соответственно, по сравнению с 1-, 2- и 3-й неделями. К 3-й неделе данный показатель был ниже на 74,7% по сравнению со 2-й неделей.

Численная плотность эритроцитов через 4 нед после имплантации Коллоста с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения стала ниже в 3,3; 5,4 и 5,9 раза, соответственно, чем через 1, 2 и 3 нед.

Процентное содержание моноцитов через 4 нед уменьшилось в 2,2 раза по сравнению с 3 неделей. Абсолютное содержание моноцитов спустя 4 нед после операции уменьшилось в 3,4; 5,7 и 6,3 раза, соответственно, относительно 1-, 2- и 3-й недель. Относительное содержание макрофагов было максимальным через 4 нед. Число макрофагов на единицу площади

среза через 2 нед было больше на 89,4% и в 3 раза, соответственно, по сравнению с 1-й и 4-й неделями. При этом к 3-й неделе данный показатель был выше в 3 и 4,7 раза, соответственно, относительно 1-й и 4-й недель.

Начиная со 2-й недели в Коллосте появлялись гигантские клетки инородных тел. Через 2 нед такие клетки присутствовали в единичных наблюдениях, через 3 нед были найдены во всех срезах, преимущественно рядом с более плотными коллагеновыми депозитами. Через 4 нед в ряде случаев на периферии плотной волокнистой соединительной ткани на месте коллагеновой мембраны многоядерных макрофагов уже не было.

Относительное содержание клеток с явлениями деструкции через 4 нед уменьшилось в 2,9 раза по сравнению с 3-й неделей. Численная плотность клеток с признаками деструктивных изменений через 3 нед была больше в 2,9 и 8,6 раза, соответственно, по сравнению с 1-й и 4-й неделями.

В качестве результатов применения МСК можно отметить увеличение численной плотности всех клеток через 1 и 2 нед после имплантации на 66,4% и 59%, соответственно, а через 4 нед – уменьшение в 2,7 раза, по сравнению с внедрением Коллоста без МСК.

Процентное содержание моноцитов и клеток с явлениями деструкции, абсолютное содержание лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и клеток с признаками деструктивных изменений через 4 нед после операции были ниже в 2,2; 2,7; 2,2; 2,7; 5,6 и 7,6 раза, соответственно, чем после имплантации Коллоста без использования МСК. Процентное содержание макрофагов через 1 нед и их абсолютное количество через 1 и 2 нед были больше на 50,9%; в 2,5 раза и на 82,8%, соответственно, чем после внедрения коллагеновой мембраны без МСК. При этом через 3 нед статистически достоверных различий не было, а к 4-й неделе численная плотность таких фагоцитов после применения клеточных технологий стала уже меньше в 2,8 раза.

Относительное количество эритроцитов через 1 нед и число их на единицу площади среза спустя 1 и 2 нед были больше в 3,7; 5,4 и 2,7 раза, соответственно, чем в такие же сроки после внедрения коллагеновой мембраны без аутологичных МСК костномозгового происхождения.

На фоне быстрого лизиса и замещения Коллоста соединительной тканью реципиента через 4 нед после имплантации уменьшалась интенсивность воспалительного процесса, обусловленного присутствием инородного тела в тканях. В связи с этим на периферии коллагенового материала снижалась и общая численность клеток, в частности, лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и клеток с признаками деструктивных изменений.

Морфометрические показатели изучения влияния мультипотентных стромальных клеток на деградацию центральной части имплантированного коллагена. В течение недели после имплантации клетки и сосуды находились в основном на периферии Коллоста. Только через 2 нед единичные клетки и сосуды появлялись в центральных областях коллагеновой мембраны. В связи с этим изучение васкуляризации и клеточной инфильтрации центральных зон имплантированного Коллоста было проведено только начиная со 2-й недели.

После имплантации Коллоста без аутологичных МСК костномозгового происхождения объемная плотность кровеносных сосудов в центре материала через 3 и 4 нед после операции возрастала в 2,1 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению со 2-й неделей (табл. 2). Объемная плотность лимфатических сосудов спустя 3 и 4 нед после имплантации увеличилась в 4,5 и 3,8 раза, соответственно, относительно 2-й недели (см. табл. 2). Объемная плотность клеточных элементов через 3 и 4 нед после операции возросла в 6,2 и 5,3 раза, соответственно, по сравнению со 2-й неделей (см. табл. 2). Объемная плотность оставшегося Коллоста и вновь синтезированного межклеточного матрикса к 3-й и 4-й неделям после имплантации без МСК была статистически значимо меньше на 47,5% и 43,6%, соответственно, чем через 2 нед.

Таблица 2 – Структурная организация центральной части имплантированной коллагеновой мембраны ($S \pm \sigma$)

Параметр	Срок после имплантации			
	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед
1	2	3	4	5
Имплантация без МСК				
Кровеносные капилляры (A_A)	В центре Коллоста структуры отсутствуют	2,87±0,915 ^{4, 5}	6,0±1,0 ³	6,93±0,961 ³
Лимфатические капилляры (A_A)		2,73±0,884 ^{4, 5}	12,2±1,01 ³	10,5±1,06 ³
Интерстициальные пространства (A_A)		11,3±1,59	12,7±1,29	14,0±1,36
Клеточные элементы (A_A)		2,33±1,35 ^{4, 5}	14,5±1,41 ³	12,4±1,3 ³
Коллост и межклеточный матрикс (A_A)		80,7±2,09 ^{4, 5}	54,7±2,58 ³	56,2±2,14 ³
Имплантация с применением МСК				
Кровеносные капилляры (A_A)	В центре Коллоста структуры отсутствуют	3,2±1,21 ⁴	10,4±1,3 ^{3, 5*}	2,93±1,03 ^{4*}
Лимфатические капилляры (A_A)		2,67±0,816 ⁴	11,1±1,16 ^{3, 5}	2,87±0,915 ^{4*}
Интерстициальные пространства (A_A)		11,6±1,35 ⁵	11,7±1,95 ⁵	5,47±1,19 ^{3, 4*}
Клеточные элементы (A_A)		5,47±0,64 ^{4, 5*}	13,5±1,68 ³	13±1,41 ³
Коллост и межклеточный матрикс (A_A)		77,1±2,09 ⁴	53,3±2,41 ^{3, 5}	75,7±2,09 ^{4*}

Примечание: A_A – относительная площадь структур на срезе (%); ^{2, 3, 4, 5} – величины, достоверно различающиеся между собой в данных колонках ($p \leq 0,05$); * – величины, достоверно отличающиеся от соответствующих у животных после имплантации без МСК ($p \leq 0,05$).

После имплантации Коллоста с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения выраженность васкуляризации в центре коллагенового материала была максимальной через 3 нед после операции. Объемная плотность кровеносных сосудов через 3 нед была больше в 3,3 и 3,5 раза, соответственно, чем через 2 и 4 нед (см. табл. 2). Объемная плотность лимфатических сосудов спустя 3 нед после имплантации была выше в 4,2 и 3,9 раза, соответственно, относительно 2-й и 4-й недель. Объемная плотность интерстициальных пространств к 4-й неделе уменьшилась в 2,1 раза по сравнению со 2-й и 3-й неделями. Объемная плотность клеток через 3 и 4 нед после операции стала больше в 2,5 и 2,4 раза, соответственно, чем через 2 нед. Объемная плотность нелизированного Коллоста и вновь синтезированного межклеточного матрикса спустя 3 нед после имплантации мембраны с адсорбированными МСК была статистически достоверно ниже на 44,7% и 42%, соответственно, чем через 2 и 4 нед (см. табл. 2).

В качестве результатов применения клеточных технологий можно отметить, что объемная плотность кровеносных сосудов через 3 нед после имплантации была больше на 73,3%, а к 4-й – меньше в 2,4 раза, чем в аналогичные сроки после внедрения Коллоста без МСК (см. табл. 2).

В результате дифференцировки аутологичных МСК костномозгового происхождения в клеточные элементы сосудистых оболочек (Майбородин И.В. и др., 2013, 2015) васкуляризация центра имплантированного Коллоста максимально сильно выражена через 3 нед после операции. Ускоренный рост кровеносных сосудов способствует миграции в Коллост клеточных элементов, которые лизируют внедренный коллаген и синтезируют или участвуют в синтезе коллагена реципиента. В результате, через 4 нед уже весь Коллост подвергался деструкции и адсорбции, а на его месте развивалась плотная волокнистая соединительная ткань. Активность воспаления, поддерживаемого присутствием в тканях инородного тела, через 4 нед резко снижалась. К этому сроку подвергалась инволюции часть молодых сосудов и уменьшалась объемная плотность кровеносных сосудов.

Объемная плотность лимфатических сосудов и интерстициальных пространств через 4 нед после операции была меньше в 3,7 и 2,6 раза, соответственно, по сравнению с имплантацией Коллоста без использования МСК (см. табл. 2). Такое снижение объемной плотности лимфатического русла в центре лизируемого Коллоста спустя 4 нед, наиболее вероятно, связано с полной деструкцией этого материала и уменьшением активности воспалительного процесса, обусловленного наличием инородного тела в тканях.

Объемная плотность оставшегося Коллоста и межклеточного матрикса через 4 нед после имплантации статистически значимо больше на 34,7%, чем в аналогичный срок после внедрения Коллоста без МСК (см. табл. 2).

На фоне внедрения Коллоста без МСК численная плотность всех клеток в центральных частях коллагенового материала через 3 и 4 нед после операции стала больше в 2,8 и 2,7 раза, соответственно, чем через 2 нед. Такое нарастание клеточной инфильтрации центра имплантированного материала свидетельствует как об усиливающихся процессах его деградации, так и о возрастающей интенсивности асептического воспаления, сопровождающего присутствие инородного материала в тканях. Относительное содержание лимфоцитов спустя 4 нед после имплантации было меньше на 34,2%, чем через 2 нед. Абсолютное количество лимфоцитов через 3 нед после операции возросло в 2,3 раза по сравнению со 2-й неделей.

Процентное содержание нейтрофилов через 3 и 4 нед после операции уменьшалось на 84,3% и в 2,4 раза, соответственно, по сравнению со 2-й неделей. Уменьшение относительного количества лимфоцитов и нейтрофилов на фоне одновременного увеличения абсолютного содержания лимфоцитов свидетельствует о снижении остроты воспалительного процесса. Через 3 и 4 нед в остатках коллагеновой мембраны были найдены тканевые базофилы. Появление этих клеток, скорее всего, связано с ангиогенезом и замещением биодеградируемого имплантата соединительной тканью реципиента.

Процентное содержание и численная плотность эритроцитов через 4 нед после имплантации Коллоста без аутологичных МСК костномозгового происхождения стали больше в 3,6 и 9,1 раза, соответственно, чем через 2 нед. Такое увеличение численности клеток красной крови в тканях также указывает на активную воспалительную реакцию, вызванную присутствием инородного тела и сопровождаемую микроциркуляторными нарушениями (Кузин М.И., Костюченко Б.М., 1990).

Абсолютное количество моноцитов спустя 3 и 4 нед после операции возросло в 2,8 и 2,7 раза, соответственно, относительно 2 нед. Относительное содержание макрофагов через 2 нед было меньше на 72,1% и в 2,2 раза, соответственно, по сравнению с 3-й и 4-й неделями. При этом через 4 нед данный показатель стал выше на 25,3%, чем был через 3 нед. Число макрофагов в единице площади среза через 3 и 4 нед после операции возросло в 4,8 и 5,8 раза, соответственно, относительно 2-й недели.

Начиная с 3-й недели в центре Коллоста появлялись гигантские клетки инородных тел. Чаще всего такие клетки были расположены возле оставшихся нелизированных плотных гомогенных коллагеновых депозитов, интенсивно окрашивающихся эозином.

Численная плотность клеток с признаками деструкции через 3 и 4 нед возросла в 3,3 и 4 раза, соответственно, по сравнению со 2-й неделей. Подобная динамика содержания нежизнеспособных клеток также подтверждает высокую активность воспаления и большое содержание в поврежденных тканях, в том числе и в лизируемом Коллосте и формируемой на его месте соединительной ткани, антигенных и токсических веществ. Под действием этих соединений и происходит повреждение клеток, в результате чего лейкоциты приобретают характерный для деструктивных изменений вид.

В результате внедрения Коллоста с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения численная плотность всех клеток в центре коллагеновой мембраны через 3 нед после операции стала больше на 73,4% и в 2,6 раза, соответственно, чем через 2 и 4 нед. К 4-й неделе этот показатель уменьшился на 49,8%, даже по сравнению со 2-й неделей.

Процентное содержание лимфоцитов спустя 3 нед после имплантации было меньше на 50 и 81,4%, соответственно, относительно 2-й и 4-й недель. К 4-й неделе данный показатель стал статистически достоверно больше на 20,9% по сравнению со 2-й неделей. Относительное содержание нейтрофилов через 4 нед стало меньше на 86,4% по сравнению со 2-й неделей. Абсолютное количество нейтрофилов к 4-й неделе после операции снизилось в 2,8 и 3,1 раза, соответственно, по сравнению со 2-й и 3-й неделями. Так же, как и при имплантации Коллоста без аутологичных МСК костномозгового происхождения, в этой группе животных через 3 и 4 нед были обнаружены тканевые базофилы.

Относительное содержание эритроцитов снизилось через 4 нед в 2,2 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению со 2-й и 3-й неделями. Численная плотность эритроцитов через 4 нед после имплантации Коллоста с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения стала меньше в 3,2 и 6 раз, соответственно, при сравнении со 2-й и 3-й неделями.

Процентное содержание моноцитов через 4 нед снизилось в 2,1 и 2,3 раза, соответственно, по сравнению со 2-й и 3-й неделями. Абсолютное содержание моноцитов спустя 4 нед после операции сократилось в 3,1 и 5,8 раза, соответственно, относительно 2-й и 3-й недель. Относительное содержание макрофагов было максимальным через 3 нед, возросло на 70,9 и 71,7%, соответственно, относительно 2-й и 4-й недель. Число макрофагов на единицу площади среза через 3 нед было больше в 3 и 4,4 раза, соответственно, по сравнению со 2-й и 4-й неделями.

В этой группе животных уже через 2 нед в центре коллагеновой мембраны формировались гигантские клетки инородных тел, которые там можно было найти и в другие сроки, вплоть до конца эксперимента. И хотя через 4 нед остатки Коллоста уже исчезали из места имплантации, в плотной волокнистой соединительной ткани, фактически рубце, на месте имплантированного коллагена все еще присутствовали небольшие гранулемы с инородным материалом внутри.

Относительное содержание клеток с явлениями деструкции через 4 нед уменьшилось в 2,5 раза, по сравнению со 2-й и 3-й неделями. Численная плотность таких клеток через 4 нед стала меньше в 3,6 и 6,4 раза, соответственно, по сравнению со 2-й и 3-й неделями.

Необходимо отметить, что после имплантации Коллоста как с адсорбированными МСК, так и без них, наибольшая выраженность воспалительного процесса обнаружена через 3 нед, когда происходила активная деградация инородного тела. Однако к 4-й неделе после внедрения коллагенового материала без МСК в тканях еще оставались более плотные депозиты имплантированного коллагена с активными клеточными и сосудистыми реакциями. Тогда как после использования клеточных технологий в течение 4 нед завершалась полная деградация внедренного Коллоста, в том числе и его более плотных фрагментов, и, соответственно, резко падала активность воспалительного процесса, сохраняющегося, в основном, рядом с оставшимися гранулемами инородных тел.

В качестве эффекта применения аутологичных МСК костномозгового происхождения можно отметить, что численная плотность всех клеток через 2 нед после имплантации была больше на 49,8%, а через 4 нед, наоборот, меньше в 2,7 раза, чем в аналогичные сроки после внедрения Коллоста без МСК. Процентное содержание лимфоцитов через 3 нед было меньше на 44,5%, а через 4 нед уже выше на 43,7% относительно соответствующих сроков после имплантации коллагеновой мембраны без МСК. Количество нейтрофилов на единицу площади среза через 4 нед после операции было ниже в 2,8 раза, чем после имплантации Коллоста без использования МСК. Относительное число эритроцитов через 2 нед после имплантации было больше в 3,1 раза, а через 4 нед, наоборот, меньше в 2,5 раза, чем после имплантации Коллоста без МСК. Численная плотность эритроцитов через 2 нед была выше в 4,6 раза, а через 4 нед уже ниже в 6,3 раза относительно соответствующих сроков после внедрения коллагеновой мембраны без МСК.

Процентное и абсолютное содержание моноцитов через 4 нед были меньше в 2,3 и 5,8

раза, соответственно, относительно имплантации коллагеновой мембраны без МСК. Относительная численность макрофагов через 2 и 3 нед после имплантации была больше на 54,4 и 53,4%, соответственно, а через 4 нед, наоборот, меньше на 40,3%, чем после внедрения Коллоста без МСК. Количество макрофагов на единицу площади среза через 2 нед было больше в 2,3 раза, а через 4 нед уже ниже в 3,7 раза относительно соответствующих сроков после имплантации коллагеновой мембраны без МСК. Относительное содержание клеток с признаками деструкции через 4 нед после имплантации было меньше в 2,4 раза, чем в этот срок после внедрения Коллоста без МСК. Численная плотность клеток с признаками деструктивных изменений через 2 нед была выше в 2,3 раза, а через 4 нед уже ниже в 6,3 раза относительно имплантации коллагеновой мембраны без МСК.

Таким образом, аутологичные МСК костномозгового происхождения вызывают усиление клеточной инфильтрации в первые сроки после имплантации Коллоста. Скорее всего, это происходит в результате прямого привлечения лейкоцитов детритом МСК, обладающим определенной антигенностью (Camp D.M. et al., 2009; Zangi L. et al., 2009). Клеточная инфильтрация биodeградируемого инородного материала способствует его быстрой деструкции (Ye Q. et al., 2010), так как привлеченные детритом лейкоциты активно фагоцитируют не только остатки аутологичных МСК костномозгового происхождения, но и коллагеновый материал Коллоста (Amerongen van M.J. et al., 2006).

ВЫВОДЫ

1. Асептический воспалительный процесс инициируется сразу после подкожной имплантации коллагеновой мембраны, сначала в ответ на операцию с повреждением тканей для внедрения инородного материала, а затем – на само присутствие в организме чужеродного объекта. Активность воспаления увеличивается по мере нарастания деструкции коллагенового изделия, и снижается при его полном лизисе.

2. После имплантации в подкожную клетчатку крыс коллагеновой мембраны, из окружающих тканей сначала на ее периферию, а потом и в центральные отделы прорастают сосуды и мигрируют клетки. Через 3 нед васкуляризация и клеточная инфильтрация краев и центральных отделов коллагенового материала практически выравниваются. Численность сосудов и клеточных элементов резко нарастает до 3-й недели и остается на этом уровне до окончания полной деструкции инородного тела.

3. Постепенно весь внедренный коллаген поглощается фагоцитами и замещается соединительной тканью реципиента с выраженным межклеточным веществом и низким содержанием клеток и сосудов, этот процесс длится более 4 нед. Так как инородный коллагеновый материал подвергается быстрой деградации с краев, вокруг него не успевает формироваться отграничивающая капсула из соединительной и фиброзной ткани.

4. Наряду с быстро разрушающейся основной массой имплантированной коллагеновой мембраны, в тканях присутствуют ее фрагменты, остающиеся нелизированными в течение длительного времени и выглядящие как плотные гомогенные эозинофильные депозиты. Наиболее вероятной причиной появления таких объектов являются отличия структуры коллагена в данных участках или какие-либо примеси. Эти медленно подвергающиеся деструкции участки коллагена служат причиной развития гранулематозного воспаления с формированием гигантских клеток инородных тел к 3-й неделе после операции.

5. Отличительной особенностью применения коллагеновой мембраны с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения является усиление васкуляризации соответственно в 3,4 раза и на 73,6% (в том числе и за счет формирования сосудов с участием введенных МСК) и клеточной инфильтрации на 66,4 и 59% в периферических отделах через 1 и 2 нед после операции. В центре имплантата при использовании МСК объемная плотность кровеносных сосудов через 3 нед увеличена на 73,3%, а клеточная инфильтрация – на 49,8%.

6. После полного лизиса коллагеновой матрицы выраженность воспаления значительно снижается, уменьшаются количественные показатели васкуляризация (в 2,6 раза) и клеточной инфильтрация (в 2,7 раза) окружающих тканей. Лимфангиогенез с участием введенных МСК обуславливает более эффективное удаление продуктов гидролиза и лизиса имплантированного коллагена, что также создает условия для более быстрого и полного разрушения инородного объекта.

7. В течение 2 – 3 нед все аутологичные МСК костномозгового происхождения, введенные в ткани вместе с коллагеновой мембраной, разрушаются и фагоцитируются макрофагами, одновременно исчезают структуры, созданные из этих МСК в результате их дифференцировки. Лейкоциты фагоцитируют и лизируют не только дебрис аутологичными МСК костномозгового происхождения, но и коллагеновую матрицу, что способствует более быстрой деструкции внедренного коллагена.

8. Гранулемы инородного тела в подкожной клетчатке крыс после имплантации коллагенового изделия с адсорбированными аутологичными МСК костномозгового происхождения образуются на 1 нед раньше, чем после внедрения чистого коллагена. Весь коллагеновый материал вместе с более плотными участками подвергается полной деструкции также на 1 нед раньше (через 4 нед). Такое ускорение деградации медленно лизируемых фрагментов инородного тела после применения МСК обусловлено ранним появлением (уже через 2 нед) в этих плотных структурах многоядерных макрофагов со слившейся цитоплазмой.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для внедрения в организм следует выбирать наиболее однородные коллагеновые материалы, без отличающихся по плотности участков, так как медленно деградирующие фрагменты могут быть причиной развития гранулематозного воспаления и неудачи самой процедуры имплантации.

2. Обнаруженное усиление васкуляризации с участием введенных аутологичных МСК костномозгового происхождения в формировании сосудистых оболочек, а далее элиминация этих клеток из стенок сосудов являются основной причиной возрастания содержания эритроцитов в тканях в первые сроки после внедрения коллагеновой мембраны с адсорбированными МСК. В связи с этим целесообразны разработка и проведение мероприятий, направленных на стабилизацию и уменьшение проницаемости сосудистой стенки при процедурах имплантации в условиях использования клеточных технологий.

3. Через 2 – 3 нед после внедрения коллагена с адсорбированными МСК, мембраны которых мечены флюоресцентным красителем Vybrant-CM-Dil, оболочки крупных и мелких сосудов, расположенных в подкожно-жировой клетчатке на некотором удалении от места операции, приобретают способность к очень интенсивной люминесценции при использовании фильтра для родамина. На основании этого возможно применение Vybrant-CM-Dil для избирательного окрашивания эластиновых структур сосудистых оболочек и эндотелиальной выстилки с целью их идентификации, обнаружения и изучения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Майборodin И.В., Хоменюк С.В., Михеева Т.В., Ярин Г. Ю., Майбородина В.И., Оноприенко Н.В., Вильгельми И.А., Шевела А.И. Имплантация коллагеновой мембраны с адсорбированными мультипотентными стромальными клетками в эксперименте // Клінічна хірургія. – 2019. – Т. 86, № 6. – С. 53-59. DOI: 10.26779/2522-1396.2019.06.53.

2. Майборodin И.В., Хоменюк С.В., Михеева Т.В., Ярин Г.Ю., Майбородина В.И., Вильгельми И.А., Шевела А.И. Ускорение биodeградации полимера на основе коллагена после адсорбции мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток в эксперименте // Трансляційна медицина. – 2019. – Т. 6, № 5. – С. 55–67. doi.org/10.18705/2311-4495-2019-6-5-55-67.

3. Майбородин И.В., Хоменюк С.В., Михеева Т.В., Ярин Г.Ю., Майбородина В.И., Агзаев М.К., Вильгельми И.А., Шевела А.И. Некоторые особенности имплантации в условиях применения клеточных технологий // *Клінічна хірургія*. – 2019. – Т. 86, № 9. – С. 65-73. DOI: 10.26779/2522-1396.2019.09.65.

4. Ярин Г.Ю., Шевела А.И., Надеев А.П., Михеева Т.В., Хоменюк С.В., Майбородин И.В. Исследование результатов адсорбции мультипотентных стромальных клеток на полимерных материалах, применяемых в урологии // **Современные проблемы науки и образования**. – 2022. – № 4; URL: <https://science-education.ru/article/view?id=31920> (дата обращения: 06.08.2022). doi: 10.17513/spno.31920.

5. Михеева Т.В., Хоменюк С.В., Майбородин И.В. Влияние клеточных технологий на имплантацию биodeградируемых материалов // *Материалы VI съезда Российского общества патологоанатомов*. – М: Группа МДВ, 2022. – С. 100-101.

6. Майбородин И.В., Кузькин С.А., Хоменюк С.В., Михеева Т.В., Шевела А.А. Экспериментальная имплантация коллагеновой мембраны с мультипотентными стромальными клетками. // *Стоматология и челюстно-лицевая хирургия / Материалы 17-го Сибирского конгресса*. - Новосибирск: ИПЦ НГМУ, 2022. – С. 135-147.

7. Хоменюк С.В., Шевела А.И., Клиникова М.Г., Майбородин И.В. Морфологические результаты имплантации коллагеновой мембраны с адсорбированными мультипотентными стромальными клетками в эксперименте // **Современные проблемы науки и образования**. – 2023. – № 2; URL: <https://science-education.ru/article/view?id=32478>

Соискатель

С.В.Хоменюк