

INFLUENCES OF HEXAPEPTIDE ARGINYL-ALPHA-ASPARTYL-LIZIL-VALYL-TYROSIL-ARGININ ON THE TRANSFORMED PHENOTYPE OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF HEALTHY PERSONS IN THE EXPERIMENTAL SYSTEM *IN VITRO*

Nesterova I. V., Khaidukov S. V., Nguyen T. D. L., Ronzhina A. N.

The experimental model of the *in vitro* transformed phenotype of neutrophilic granulocytes (NG) equipped with receptors CD64, CD32, CD16, CD11b, was created under the influence of fMLPs. The features of the transformed phenotype of NG were described. The influence of the Hexapeptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-poured-tyrosyl-arginine (HP) on untransformed and transformed phenotype of NG was investigated *in vitro*. It was shown that fMLP increases the number of NG, expressing the receptor CD64, increases the density of expression of the receptor CD11b, and moderately reduces the amount of CD32⁺ NG. HP does not influence on the number of NG, bearing receptors CD64, CD32, CD16, CD11b, and the level of their expression. At the same time with simultaneous incubation with fMLP NG and HP, are shown to mitigate the effects of fMLP: reduced the number of CD64⁺ NG, reduced the density of CD11b expression, decreases in the number of NG bearing a receptor CD32. Overall, the results demonstrate the classic immunomodulatory effect HP: on the one hand, the absence of any change in the studied receptors of NG under his influence and leveling the transformational changes of phenotypic characteristics of NG, which arose under the influence of fMLP.

Key words: neutrophils, the transformed phenotype, fMLP

РОЛЬ МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В ДИНАМИКЕ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭЛАСТИНОВОГО БИОМАТЕРИАЛА

Нигматуллин Р. Т., Гизатулина Э. Р., Мотыгуллин Б. Р.

ФГБУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии
Минздрава России, Уфа, Россия

В статье представлены результаты морфологических исследований при подкожной трансплантации двух видов эластинового биоматериала: структурированного и диспергированного (патент № 2440148). Эксперименты выполнены на крысах породы Вистар (n=59). Трансплантируемые биоматериалы подвергаются поэтапной резорбции с формированием соединительнотканного регенерата. При этом клетки макрофагальной и фибробластического дифференцировки выступают как единая морфофункциональная система, обязательным элементом которой являются гигантские многоядерные клетки. В зависимости от структуры биоматериала выделены два гистолопографических типа заместительной регенерации: фронтальный для структурированного и диффузно-локунарный – для диспергированного.

Ключевые слова: эластиновый биоматериал, макрофаги, гигантские многоядерные клетки

Актуальность и цель работы. В современной клинической медицине значительное место занимают различные виды биоматериалов, используемые при выполнении реконструктивных операций. Регистрация подобных транс-

плантатов требует проведения протокольных доклинических испытаний. Публикации последних лет указывают на повышенный интерес исследователей к биоматериалам на основе эластина [1, 2, 3]. Авторы отмечают, что данные

трансплантаты, обладая адекватными адгезивными и морфогенетическими свойствами, являются хорошим субстратом для регенерации тканей реципиента.

Во Всероссийском центре глазной и пластической хирургии разработано два базовых вида эластических биоматериалов, которые прошли необходимые этапы экспериментального тестирования: структурированной и диспергированной формы [4].

При проведении доклинических испытаний нами учитывались результаты исследований, указывающих на важную роль иммунной системы в процессе репаративной регенерации, в том числе при трансплантации тканей [5].

Учитывая изложенное, нами определена следующая цель настоящей работы: раскрыть роль моноцитарно-макрофагальной системы в процессе заместительной регенерации при экспериментальной трансплантации эластического биоматериала.

Материалы и методы исследования. Подкожная трансплантация диспергированной и структурированной формы эластинового биоматериала проводилась на крысах породы Вистар ($n=59$). Указанные биоматериалы отвечают разработанным медико-техническим требованиям [4]. Диспергированный материал вводился инъекционным методом подкожно в область голени. Структурированный биоматериал в виде пластины размерами $10 \times 5 \times 1,5$ мм имплантировался также подкожно в область голени. Животные выводились из опыта на 10-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента. Биоматериал с прилежащим тканевым тканевым ложем забирался для консервации. Срезы окрашивались по методу Малори, Ван-Гизона, гематоксилином и эозином. Проводились также электронно-микроскопические и поляризационно-оптические исследования.

Полученные результаты. Пересадка эластических трансплантатов приводит к последовательной реализации целого комплекса клеточных и сосудистых реакций, которые можно определить как процесс заместительной регенерации с формированием соединительнотканного регенерата. Так, при инъекции диспергированной формы биоматериала на 10-е сутки эксперимента в трансплантате определяется полиморфный инфильтрат с доминированием клеток макрофагального дифферона и недифференцированных соединительнотканых клеток. При этом гигантские многоядерные клетки

(ГМК) выявляются между отдельными эластическими волокнами или их пучками. Судить о плотности инфильтрата можно по диаметру эластических волокон, который колеблется от 5 до 9 мкм, а также пучков волокон, которые варьируют от 25-30 до 60 мкм. Следует отметить, что инфильтрат имеет выраженный диффузный характер. На его фоне определяются многоядерные фагоциты, которые без определенной закономерности разбросаны на протяжении трансплантата. По размерам гигантские клетки можно разделить на формирующиеся (размер 25×35 мкм), средние (35×45 мкм) и зрелые формы (90×140 мкм). При этом количество ядер в одной агломерации пропорционально возрастает от 4-7 до 17-18. Зрелые формы содержат наиболее крупные фаголизосомы. В результате резорбции биоматериала ГМК формируют для себя лакуны, вокруг которых концентрируются клетки фибробластического дифферона. В этих зонах уже определяются вновь синтезированные коллагеновые волокна (КВ). Следует также отметить, что в составе клеточного инфильтрата в данный срок определяются единичные эозинофилы, появляются эндотелиальные тяжи, формирующие просвет новообразованных капилляров.

На 14-е сутки эксперимента количество макрофагов и ГМК увеличивается. Четко прослеживаются этапы развития трех основных форм многоядерных клеток. Формирующиеся ГМК включают не более 4-5 ядер, окруженных узким ободком цитоплазмы. Размер клеточной агломерации составляет 7×15 мкм. В средних ГМК при размере 25×30 мкм появляются фагосомы. И, наконец, в зрелых формах ГМК при размере 40×60 мкм насчитывается 12-13 ядер и определяются наиболее крупные фагосомы. При этом ядра концентрируются по периферии клетки, освобождая центральную зону для крупных фагосом. По-видимому, описанные формы ГМК представляют собой различные стадии их развития. Примечательно, что гигантские клетки окружены пролиферирующей волокнистой соединительной тканью, где идет активный синтез внеклеточного матрикса. В составе клеточного окружения, вокруг лакун ГМК, доминируют клетки макрофагального и фибробластического дифферона, сохраняются единичные эозинофилы. Выявляемые макрофагально-фибробластические контакты, указывают на тесное морфофункциональное взаимодействие данных видов клеток.

На 30-е сутки клеточный состав в зоне регенерации меняется. Преобладают клетки фибробластического дифферона: юные фибробласты, коллагенобласты. Встречаются локусы пигментных клеток. Активно формируются звенья микроциркуляторного русла. Фибрилло- и ангиогенез становятся доминирующими факторами на данном этапе морфогенеза.

При пересадке структурированного эластического трансплантата, в целом состав клеточного инфильтрата идентичный, однако существенно меняется их гистотопографические зоны. На 10-е сутки эксперимента происходит активная инфильтрация краевых зон трансплантата макрофагами, по всему периметру контакта его с тканевым ложем. Однако, мононуклеарные фагоциты, по нашим данным, не способны к резорбции эластических волокон. Именно поэтому, уже на 14-е сутки вслед за макрофагами обнаруживается зона ГМК. В целом, они уступают по размерам аналогичным клеткам в диспергированных биоматериалах. Даже зрелые формы ГМК в данной серии имеют размер от 20 до 30 мкм и не более 4-5 ядер в своей структуре. Также особенностью замещения структурированных форм биоматериала является четкая градация гистотопографических зон. Первый фронт составляют мононуклеарные фагоциты, следом располагается зона ГМК, в цитоплазме которых идентифицируются фаголизосомы. На 30-е сутки выявляются активные процессы фибрилло- и ангиогенеза. Среди клеточных форм преобладают те, которые относятся к фибробластическому дифферону. Однако и в эти сроки сохраняются мононуклеарные фагоциты и ГМК, которые несомненно выполняют роль регуляторов в процессах морфогенеза.

Обсуждение. Таким образом, представленные результаты указывают на исключительно важную роль макрофагального звена иммунной системы в процессах резорбции и заместительной регенерации эластиновых биоматериалов. Для нас очевидно, что мононуклеарные фагоциты, обладая высокими адгезивными свойствами, активно внедряются в структуры биоматериала, что позволяет им выполнять роль антигенпрезентирующих клеток, а также готовить адекватный субстрат для формирования ГМК. По нашим данным, мононуклеары не способны к резорбции эластиновых волокон, но они создают условия для формирования ГМК, которые и обеспечивают поэтапную

элиминацию матрикса биоматериала. Кроме того, макрофаги через комплекс цитокинов и прямые контакты с фибробластами оказывают регуляторное влияние на процессы репаративной регенерации, фибрилло- и ангиогенеза.

Выводы:

1. При подкожной трансплантации эластического биоматериала реализуется комплекс клеточных реакций при ведущей роли моноцитарно-макрофагальной системы, обеспечивающей поэтапный фагоцитоз волокнистого матрикса трансплантата.

2. Клетки макрофагального и фибробластического дифферонов в ходе заместительной регенерации выступают как единая морфофункциональная система, обязательным компонентом которой являются гигантские многоядерные клетки.

3. В зависимости от структурной организации биоматериала выделяются два гистотопографических типа заместительной регенерации:

- фронтальный, характерный для структурированной формы трансплантата;
- диффузно-локунарный, имеющий место при инъекции диспергированной формы биоматериала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anabami N., Mithieux S. M., Camci-Unal G., Dokmeci M. R., Weiss A. S., Khademhosseini A. Elastomeric recombinant protein-based biomaterials. *Biochemical Engineering Journal*, 77(2013), 110-118.
2. Derricks K. E., Rich C. B., Buczek-Thomas J. A., Nugent M. A. Ascorbate enhances elastin synthesis in 3D tissue-engineered pulmonary fibroblasts constructs. *Tissue and Cell* 2013, 45, 253-260.
3. Нигматуллин Р. Т., Кутушев Р. З. Применение эластинового биоматериала в восстановительной хирургии стенок глазницы. «Практическая медицина» 2016, 6(98), 119-121. Nigmatullin R. T., Kutushev R. Z. The use of elastin biomaterial in the reconstructive surgery of orbit walls. «Practical medicine» 2016, 6(98), 119-121.
4. Мулдашев Э. Р., Нигматуллин Р. Т., Галимова В. У. и др. Пат. РФ № 2440148 // Бюл. изобр. 2012. № 2 Muldashev E. R., Nigmatullin R. T., Galimova V. U. and others. Patent RF № 2440148 // Bulletin of invention 2012. № 2
5. Бабаева А. Г. Регенерация: факты и перспективы. Издательство РАМН, Москва, 2009, 336. Babaeva A. G. Regeneration: facts and perspectives. Publishing office of RAMS, Moscow, 2009, 336.

THE ROLE OF THE MONOCYTIC AND MACROPHAGAL SYSTEM IN THE DYNAMICS OF THE REPLACEMENT REGENERATION IN CASE OF THE ELASTIN BIOMATERIAL TRANSPLANTATION

Nigmatullin R. T. Gizatullina E. R., Motygullin B. R.

*The Russian Eye and Plastic Surgery Centre of the Russian Federation
Health Ministry, Ufa, Russia*

The article contains the results of the morphological investigations when subcutaneously transplanting two types of the elastin biomaterial: structurized and dispersed one (patent № 2440148). The experiments have been carried out on Wistar rats (n=59). The transplanted biomaterials were subjected to the stage-by-stage resorption with further formation of the connective tissue regenerate. When doing it, the cells of the macrophagal and fibroblastic differentiation come out as a unified morphofunctional system in which giant multinuclear cells are an indispensable element. Depending on the biomaterial structure there are singled out two histotopographic types of the replacement regeneration: frontal type for the structurized biomaterial and diffuse-locunar one for the dispersed biomaterial.

Key words: elastin biomaterial, macrophages, polynuclear cells

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

Осиков М. В., Альмухаметова О. Н., Воргова Л. В.

*ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет
Минздрава России, Челябинск, Россия*

Цель работы – в условиях *in vitro* исследовать влияние эритропоэтина (ЭПО) на поглотительную и НСТ-редуцирующую способность нейтрофилов, выделенных из крови недоношенных новорожденных (НН). Исследование выполнено на 18 новорожденных: НН от преждевременных родов (ННПР) (n=6); НН от ранних преждевременных родов (ННРПР) (n=6); НН от очень ранних преждевременных родов (ННОРПР) (n=6). ЭПО использовали в концентрациях 30 МЕ/л; 15 МЕ/л; 7,5 МЕ/л; 3,75 МЕ/л. Оценивали поглотительную способность и кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов, выделенных из пуповинной крови. У ННРПР и ННОРПР ЭПО в экспериментальных условиях *in vitro* увеличивает, а у ННПР – снижает поглотительную способность и НСТ-редуцирующую способность нейтрофилов крови. Эффект ЭПО на поглотительную способность нейтрофилов крови в экспериментальных условиях *in vitro* не зависит от гестационного возраста и проявляется в малых дозах (3,75 МЕ/л и 7,5 МЕ/л), а на НСТ-редуцирующую способность нейтрофилов крови – в больших дозах (15 МЕ/л и 30 МЕ/л).

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, эритропоэтин, нейтрофилы

Введение. Количество недоношенных новорожденных (НН) ежегодно увеличивается, на их долю приходится 10-15% от всех родов. Заболеваемость сепсисом у новорожденных обратно коррелирует с гестационным возрастом, а НН обладают повышенной чувствительностью к микробным патогенам. До 35% НН умирают из-за последствий инфекций в связи

с функциональной незрелостью врожденного и адаптивного иммунитета, поэтому возникает необходимость в коррекции иммунного статуса фармакологическими агентами эндогенного происхождения с минимальным набором побочных эффектов. В этом отношении перспективным агентом выступает эритропоэтин (ЭПО), плейотропные эффекты которого были