

И.В. МАЙБОРОДИН¹, В.В. МОРОЗОВ¹, А.А. АНИКЕЕВ¹,
Н.Ф. ФИГУРЕНКО¹, Р.В. МАСЛОВ¹, Г.А. ЧАСТИКИН¹,
В.А. МАТВЕЕВА¹, В.И. МАЙБОРОДИНА²



МАКРОФАГАЛЬНЫЙ ОТВЕТ У КРЫС НА ВВЕДЕНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕГИОН ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН¹,
ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии»², г. Новосибирск,
Российская Федерация

Цель. Доказать возможность фагоцитоза макрофагами введенных в область хирургического разреза аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения (АММСККП).

Материал и методы. Методами световой флуоресцентной микроскопии с применением моноклональных антител к антигену CD68 изучали макрофагальный ответ у 12 крыс через 2 недели после инъекции в область хирургической травмы АММСККП с трансфицированным геном GFP и дополнительно окрашенными Vybrant-CM-Dil клеточными мембранами.

Результаты. Введенные в регион хирургического разреза АММСККП частично фагоцитируются макрофагами из тканей в месте инъекции. Фагоцитоз АММСККП сопровождается быстрой деградацией белка GFP, тогда как Vybrant-CM-Dil или не разрушается ферментами лизосом, или деградирует очень медленно. Происходит накопление этого красителя в макрофагах, в результате чего фагоциты приобретают способность к интенсивной флуоресценции при облучении их ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина. АММСККП и их фрагменты могут попадать в кровеносное и лимфатическое русло и оказываться, по крайней мере, в регионарных паховых лимфатических узлах (ПЛУ), возможно захватывание АММСККП и их окрашенного детрита из просвета сосудов периваскулярными макрофагами, расположенными в отдаленных тканях. В корковом веществе ПЛУ после введения АММСККП в регион лимфосбора, на местах, соответствующих расположению лимфоидных узелков, увеличивается как число и размер скоплений крупных светящихся макрофагов, так и их количество в таких скоплениях. В некоторых фагоцитах лимфоидных узелков ПЛУ содержатся специфически окрашенные фрагменты АММСККП.

Заключение. Доказан макрофагальный фагоцитоз АММСККП из тканей в месте введения и сосудистого русла. Присутствие макрофагов с детритом АММСККП в лимфоидных узелках ПЛУ может служить косвенным подтверждением высокой вероятности инициации гуморальной иммунной защиты против антигенов, введенных АММСККП.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, лимфатические узлы, макрофаги, флуоресценция макрофагов

Objectives. To prove the possibility of phagocytosis by macrophage of autologic multipotent mesenchymal stromal cells of the bone marrow origin (AMMSCBMO) injected into the surgical site.

Methods. In 12 rats the macrophage reaction 2 weeks after the injection of AMMSCBMO with a transfected GFP-gene and additionally stained by Vybrant-CM-Dil cellular membranes into the site of a surgical trauma were investigated by light fluorescent microscopy with the application of monoclonal antibodies to CD68-antigen.

Results. AMMSCBMO injected into the site of a surgical intervention are partially phagocytized by macrophages from the tissues in the site of injection. Phagocytosis of AMMSCBMO is accompanied by rapid degradation of GFP-protein whereas Vybrant-CM-Dil either isn't destroyed by enzymes of lysosomes or degrades very slowly. The accumulation of dye in macrophages has occurred and, as a result, the phagocytes receive the ability to an intensive fluorescence in irradiation them by ultraviolet light with filter for rhodamine. AMMSCBMO and their fragments can get into the blood and lymphatic vessels and appear, at least, in the regional inguinal lymph nodes (ILN); it is possible to capture AMMSCBMO and their colored detritus from the lumen of the vessels by perivascular macrophages located in distant tissues.

In the cortex of ILN after AMMSCBMO injection in the site of lymph collection, in the sites corresponding to the location of lymphoid nodules, both the number and size of collections of large luminous macrophages, and their number in such collections have been increased. Some phagocytes from lymphoid nodules of ILN contain specifically stained AMMSCBMO fragments.

Conclusion. The macrophage phagocytosis of AMMSCBMO from the tissues in site of injection and vascular bed has been proved. Presence of macrophages with AMMSCBMO detritus in lymphoid nodules of ILN can serve the indirect confirmation of high probability of initiation of the humoral immune defense against the antigens of injected AMMSCBMO.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, lymph nodes, macrophages, macrophage fluorescence, humoral immune, lymphoid nodules, phagocytes

Novosti Khirurgii. 2017 May-Jun; Vol 25 (3): 233-241

Macrophage Reaction to Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Introduction Into Surgical Trauma Site in Rats

I.V. Maiborodin, V.V. Morozov, A.A. Anikeev, N.F. Figurenko,

R.V. Maslov, G.A. Chastikin, V.A. Matveeva, V.I. Maiborodina

Введение

Макрофаги – клетки мезенхимальной природы в организме животных и человека, способные к активному захвату и перевариванию бактерий, остатков погибших клеток и других чужеродных или токсичных для организма частиц. Макрофаги присутствуют практически в каждом органе и ткани, где они выступают в качестве первой линии иммунной защиты от патогенов и играют важную роль в поддержании тканевого гомеостаза [1, 2]. Ранее мы неоднократно сообщали о возможности фагоцитоза и лизиса макрофагами введенных в ткани на фоне послеоперационной травмы аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения (АММСККП) с трансфицированным геном белка GFP. В результате этого фагоциты могут приобретать способность к свечению (флюоресценции) при воздействии ультрафиолетовым светом [3]. Однако способностью к фагоцитозу, а значит и к приобретенной люминесценции в результате накопления флюоресцентных веществ, обладают и другие клеточные элементы, например, тучные клетки [4, 5], дендритные клетки лимфатических узлов [6, 7] и некоторые другие. Поэтому остается открытым вопрос: действительно ли обнаруженные крупные клеточные элементы в тканях и регионарных лимфатических узлах, светящиеся после введения АММСККП с трансфицированным геном белка GFP, являются макрофагами? В связи с вышеизложенным была поставлена **цель** исследования: доказать возможность фагоцитоза макрофагами введенных в область хирургического разреза аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения.

Материал и методы

В качестве модели были использованы 12 самцов крыс линии Wag весом 180–200 г, возрастом 6 месяцев. Исследования проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», все манипуляции осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом.

АММСККП получали, культивировали и

трансфицировали ДНК плазмиды, содержащей ген зеленого флюоресцентного белка GFP, в соответствии с нашими прошлыми работами [3].

Кроме того, клеточные мембраны были окрашены раствором Vybrant® CM-DiI (Thermo Fisher Scientific, USA), который окрашивает мембраны живых суспензионных или прикрепившихся клеток. Через 2 часа после трансфекции плазмидной ДНК белка GFP к суспензии АММСККП добавляли краситель Vybrant® CM-DiI из расчета 5 мкл раствора на 1×10^6 клеток в 1 мл среды без сыворотки, мягко тщательно перемешивали пипетированием и оставляли на 20 мин. в CO_2 -инкубаторе при 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 3 раза. Затем АММСККП ресуспендировали в теплой среде в объеме из расчета 1×10^6 клеток в 1 мл.

Для моделирования операционной травмы разрезали кожу в верхней трети внутренней поверхности бедра в области прохождения магистральных сосудов и сразу ушивали кожную рану. Через 1 сутки после дезинфекции кожи спиртом через кожные покровы в область хирургического вмешательства инсулиновым шприцом вводили 100 мкл суспензии АММСККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл). Животных декапитировали через 2 недели после инъекции АММСККП.

Ткани в области введения АММСККП, а также паховые лимфатические узлы (ПЛУ) фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 часов, обезвоживали в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в гистопласт. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки количества и распределения макрофагов на срезах проводили непрямую иммунопероксидазную реакцию с моноклональными антителами против CD68-антигена в соответствии с рекомендациями производителя антител: использовали набор реагентов "Dako reagents kit" (Dako, Дания). Срезы изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз. Кроме

того, неокрашенные срезы исследовали в режиме люминесценции указанного микроскопа с фильтрами Alexa 488 или для родамина.

Результаты

Практически всегда бедренные артерия и вена были окружены разной толщины массивом плотной волокнистой соединительной ткани (рис. 1 А, Б), скорее всего, сформированной на месте клетчатки, поврежденной в результате хирургического разреза с последующим ушиванием. В рубце было расположено небольшое число сосудов, единичные из которых имели слабо светящиеся стенки (рис. 1 Б, В). При изучении этих сосудов, в основном, не было отмечено значительных отличий между результатами применения фильтров Alexa 488 или для родамина (рис. 1 Г). Также в этой соединительной ткани со слабой интенсивностью флюоресцировали единичные макрофаги, свечение было незначительно ярче фона (рис. 1 В). Присутствие макрофагов в тканях рубца подтверждено иммуногистохимическим окрашиванием с использованием моноклональных антител к антигену CD68 (рис. 1 Д).

В клетчатке по краю сосудисто-нервного пучка на границе с мышечной тканью были расположены единичные, очень крупные клеточные элементы размером более 20 мкм, с положительной реакцией с антителами против CD68 (рис. 1 Е). Эти клетки (макрофаги) практически не флюоресцировали при использовании фильтра Alexa 488, но ярко светились в условиях применения фильтра для родамина, что хорошо видно при совмещении изображений, полученных при установке указанных фильтров (рис. 1 Ж, З). В процессе такого совмещения микрофотографий можно получить зеленый и красный (как вариант оранжевый и желтый) цвета, что зависит от преобладания интенсивности свечения при том или ином фильтре. Зеленый цвет дает преобладание флюоресценции при использовании фильтра Alexa 488, красный цвет получается на фоне применения родаминового фильтра, желтый, оранжевый и их оттенки появляются в результате смешения зеленого и красного цветов в той или иной пропорции.

В корковом веществе ПЛУ большинства животных присутствовали разные по размерам овальные скопления крупных флюоресцирующих клеточных элементов (рис. 2 А), расположенные в участках лимфоидной паренхимы, соответствующих лимфоидным узелкам (рис. 2 Б). Иногда (очень редко) такие скопления клеток со свечением и, соответственно, лимфоидные узелки были расположены непосредственно в

участках кровоизлияний (рис. 2 А, Б).

Следует отметить присутствие макрофагов, часто с детритом в цитоплазме, в клеточном составе этих узелков, что хорошо видно на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 2 В). Однако при использовании иммуногистохимической окраски с применением антител к макрофагальному антигену CD68 эти фагоциты были найдены в основном по периферии лимфоидных узелков, в их центре эти клеточные элементы были расположены значительно реже (рис. 2 Г). Но практически всегда в узелках была отмечена положительная реакция на этот антиген, иногда выраженная, между лимфоцитами и дифференцирующимися клетками (рис. 2 Д).

В большинстве наблюдений при исследовании светящихся клеточных элементов коркового вещества ПЛУ не было отмечено заметных различий флюоресценции при использовании фильтров Alexa 488 или для родамина (рис. 2 Е).

Но у 2 крыс в скоплениях светящихся клеток присутствовали элементы с флюоресценцией некоторых своих структур более интенсивной в условиях применения родаминового фильтра, чем фильтра Alexa 488 (рис. 2 Ж). То есть иногда свечение некоторых включений при использовании указанных фильтров совпадало и при совмещении изображений накладывалось, тогда как в других случаях часть включений флюоресцировала только в условиях использования фильтра Alexa 488, а часть — только при установке фильтра для родамина.

Еще у 2 животных скопления светящихся клеток в корковом веществе ПЛУ полностью отсутствовали, несмотря на наличие геморрагий, иногда обширных. При исследовании участков геморрагий, в том числе и с расположенными там макрофагами, с использованием различных фильтров не было найдено значительных различий свечения всех объектов (эритроцитов, макрофагов и др.).

В структурах мозгового вещества всех животных содержалось множество расположенных поодиночке клеточных элементов с положительным результатом реакции с антителами к антигену CD68. Численность и расположение этих макрофагов примерно соответствовали таковым на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, и флюоресцирующим клеточным элементам на неокрашенных срезах при изучении их в люминесцентном режиме микроскопа. При исследовании светящихся клеток мозгового вещества органов с применением различных фильтров ни в одном случае не было найдено существенных различий яркости флюоресценции.

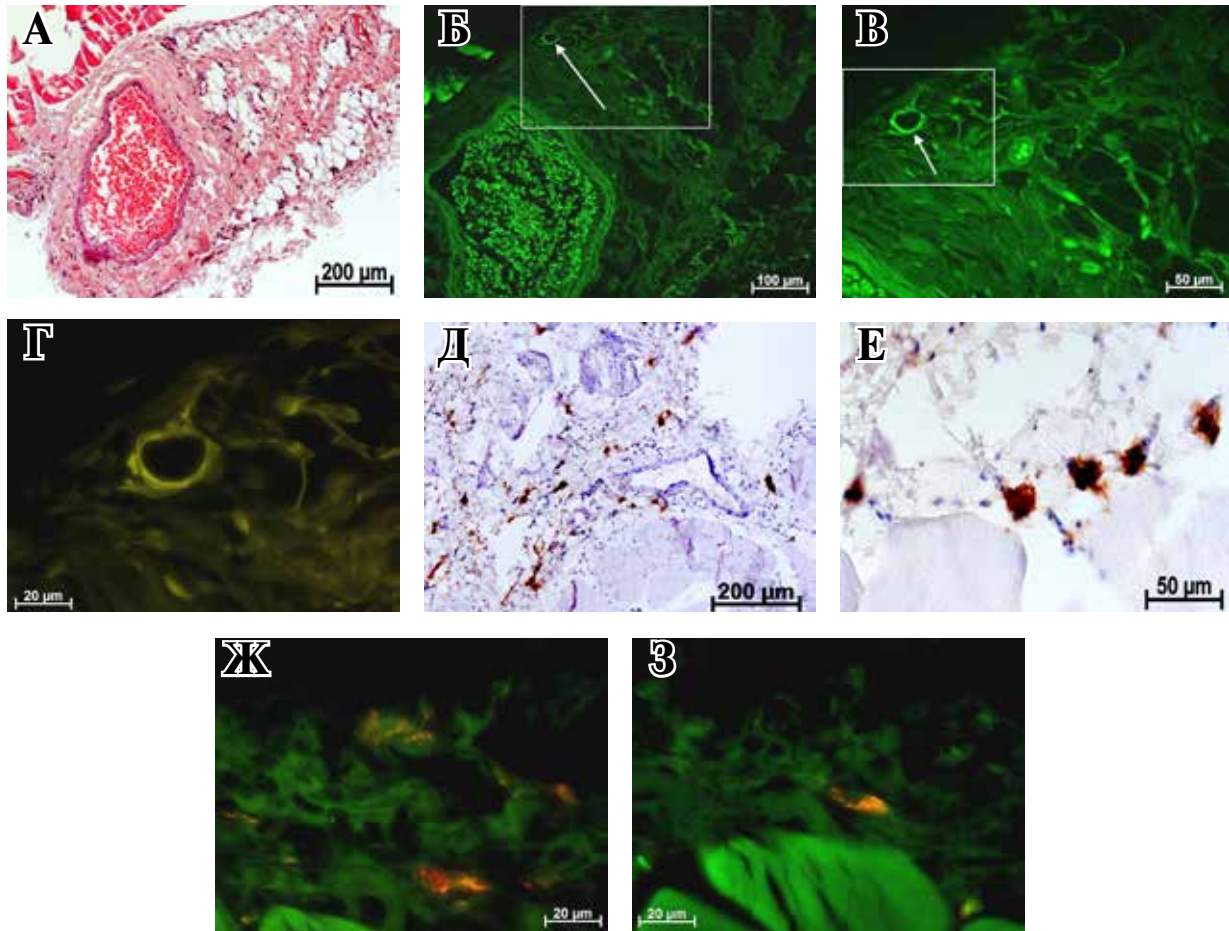


Рис. 1. Ткани вокруг магистральных сосудов бедра крыс через 2 недели после моделирования операционной травмы и введения АММСККП. А – разрастания плотной волокнистой соединительной ткани в паравазальной клетчатке. Окраска гематоксилином и эозином. Б – в паравазальной клетчатке незначительно ярче фона светятся единичные небольшие сосуды (стрелка). Неокрашенный срез в люминесцентном режиме микроскопа с фильтром Alexa 488. В – фрагмент рис. 1 Б. Флуоресцирует стенка сосуда (стрелка) и отдельные крупные клеточные элементы, расположенные на границе плотной волокнистой соединительной ткани с клетчаткой. Неокрашенный срез в люминесцентном режиме микроскопа с фильтром Alexa 488. Г – фрагмент рис. 1 Б и 1 В. Неоднородность свечения клеток в сосудистой стенке, иногда видны более темные ядра. Существенных различий при использовании фильтров Alexa 488 или для родамина нет. Результат совмещения изображений, полученных с применением указанных фильтров при изучении неокрашенного среза в люминесцентном режиме микроскопа. Д – склерозированной клетчатке присутствует множество очень крупных CD68+ клеточных элементов (макрофагов), расположенных, как правило, поодиночке. Иммуногистохимическая реакция с антителами против антигена CD68, окраска диаминобензидином и гематоксилином. Е – цепочка очень крупных CD68+ клеточных элементов расположена непосредственно в клетчатке на границе с мышечной тканью. Иммуногистохимическая реакция с антителами против антигена CD68, окраска диаминобензидином и гематоксилином. Ж – в рыхлой соединительной ткани на границе паравазальной клетчатки с мышечной тканью расположена крупная клетка размером более 20 мкм. Свечение очень слабое при использовании фильтра Alexa 488, но значительно более интенсивное на фоне применения родаминового фильтра. Результат совмещения изображений, полученных с применением указанных фильтров при изучении неокрашенного среза в люминесцентном режиме микроскопа. З – на границе мышц и клетчатки в рыхлой соединительной ткани присутствует несколько очень крупных клеточных элементов, в которых многочисленные мелкие включения очень ярко флуоресцируют при использовании родаминового фильтра. Результат совмещения изображений, полученных с применением фильтров Alexa 488 и для родамина при изучении неокрашенного среза в люминесцентном режиме микроскопа.

В процессе изучения оболочек сосудов, расположенных в капсуле и паранодальной клетчатке ПЛУ, не было найдено заметной флуоресценции, превышающей фоновые значения. Вместе с этим, в ряде случаев макрофаги, расположенные паравазально, значительно

более интенсивно флуоресцировали при использовании родаминового фильтра, чем на фоне применения фильтра Alexa 488, что также хорошо видно при совмещении изображений, полученных с использованием указанных фильтров (рис. 2 3).

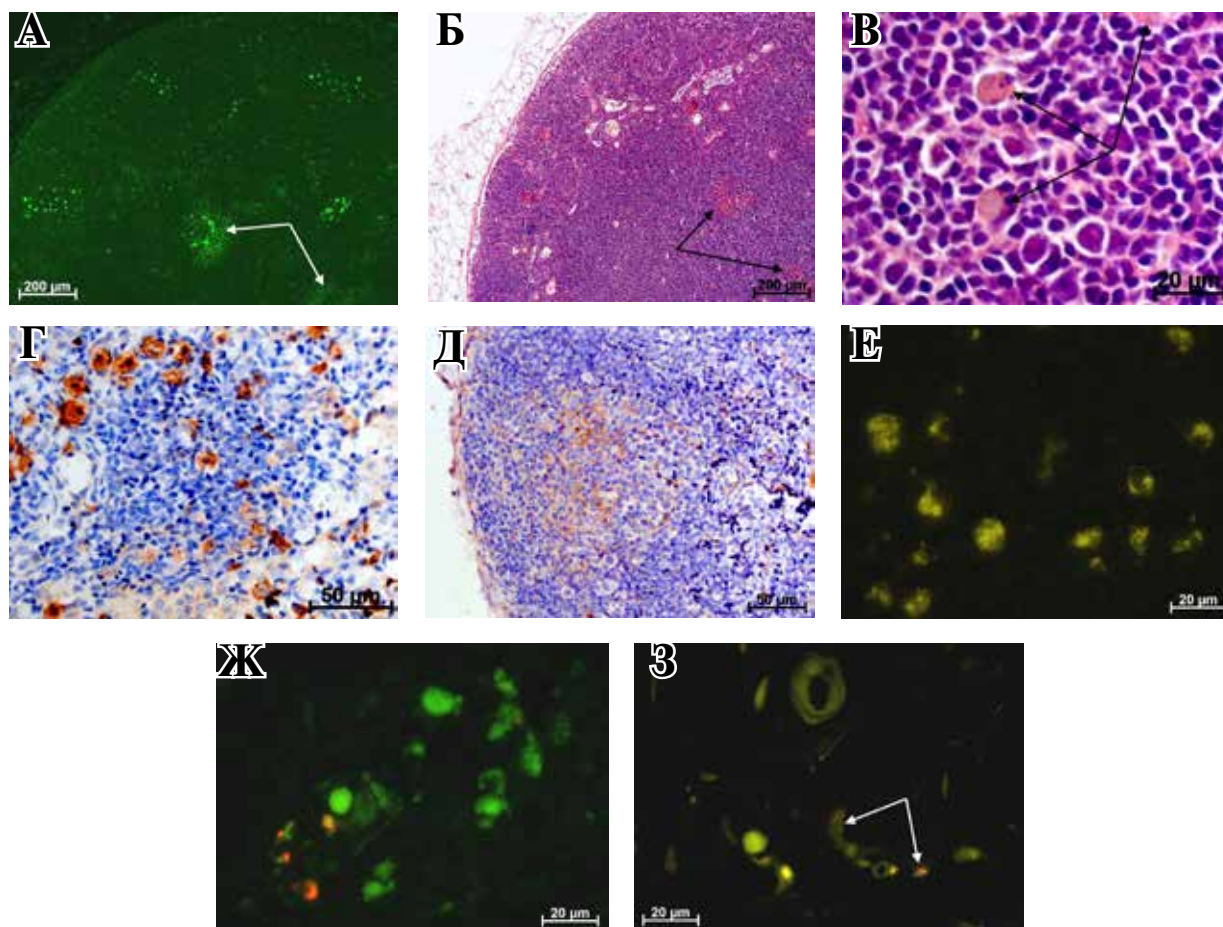


Рис. 2. ПЛУ крыс через 2 недели после ушивания хирургического разреза на бедре и применения АММСККП. А – в корковом веществе содержатся обширные скопления крупных светящихся объектов, в том числе и в участках кровоизлияний (стрелки). Неокрашенный срез в люминесцентном режиме микроскопа с фильтром Alexa 488. Б – в корковом веществе расположены лимфоидные узелки и имеются различные по размерам геморрагии (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. В – скопление крупных клеток в корковом веществе. Размер этих клеточных элементов превышает 20 мкм, ядро смещено к периферии, иногда в цитоплазме присутствуют темные включения различной формы и размера. Окраска гематоксилином и эозином. Г – крупные CD68+ клетки расположены в лимфоидном узелке, преимущественно на его периферии. Иммуногистохимическая реакция с антителами против антигена CD68, окраска диаминобензидином и гематоксилином. Д – интенсивная положительная диффузная реакция на макрофагальный антиген обнаружена между клеточными элементами лимфоидного узелка, среди клеток окружающей паренхимы специфическое окрашивание менее выражено или отсутствует. Иммуногистохимическая реакция с антителами против антигена CD68, окраска диаминобензидином и гематоксилином. Е – светящиеся клетки лимфоидного узелка очень крупные, имеют разную форму, в них флуоресцируют многочисленные мелкие включения. Существенных различий при использовании фильтров Alexa 488 или для родамина нет. Результат совмещения изображений, полученных с применением указанных фильтров при изучении неокрашенного среза в люминесцентном режиме микроскопа. Ж – скопление крупных клеток со свечением в корковом веществе. В некоторых клеточных элементах отдельные включения значительно интенсивнее светятся при использовании фильтра для родамина, чем на фоне применения фильтра Alexa 488. Результат совмещения изображений, полученных с применением указанных фильтров при изучении неокрашенного среза в люминесцентном режиме микроскопа. З – возле сосудов и мелких капилляров паранодулярной клетчатки присутствуют флуоресцирующие овальные клетки различных размеров и форм. В некоторых клеточных элементах, расположенных рядом с капиллярами, значительно интенсивнее светятся отдельные включения в условиях применения фильтра для родамина (стрелки), чем при использовании фильтра Alexa 488. Результат совмещения изображений, полученных с применением указанных фильтров при изучении неокрашенного среза в люминесцентном режиме микроскопа.

Обсуждение

В послеоперационном рубце флуоресценция единичных сосудов только в условиях применения фильтра Alexa 488 может быть не связана с использованием АММСККП и

являться или артефактом, или быть обусловленной какими-то другими причинами. Но не исключено, что такие сосуды сформированы все-таки с участием инъекционных АММСККП. В результате деления этих клеток ген GFP неизменным передается дочерным

клеткам, а концентрация родаминового красителя мембран прогрессивно уменьшается, и связанное с ним свечение становится незаметным.

Учитывая время, прошедшее с момента введения АММСККП, высокую интенсивность свечения только при использовании родаминового фильтра (отсутствие белка GFP) и наличие макрофагального антигена CD68, можно заключить, что большие светящиеся клеточные элементы в месте инъекции АММСККП и в ПЛУ вряд ли являются АММСККП или появились в результате их деления. Более вероятно, что данные клетки — макрофаги, фагоцитировавшие АММСККП или их детрит.

После попадания в ткани нежизнеспособные АММСККП, дефектные клеточные элементы и т.п. лизируются макрофагами. Следует учитывать вероятность того, что АММСККП сами по себе могут вызывать миграцию, возможно очень активную, макрофагов к месту инъекции вследствие присутствия там каких-то антигенных веществ. Такими веществами могут являться сами АММСККП из-за присутствия в геноме чужеродной ДНК и непосредственно белка GFP, некоторые компоненты культуральной среды, вирусный вектор, используемый для внедрения ДНК белка GFP в геном АММСККП, и, видимо, другие факторы.

Не исключено, что при макрофагальном лизисе АММСККП ДНК белка GFP и сам этот протеин быстро деградируют, а мембранный краситель Vybrant-CM-Dil или не разрушается ферментами лизосом, или разрушается очень медленно. В результате происходит накопление этого красителя в макрофагах, тем более что данные клетки способны фагоцитировать не одну АММСККП, а несколько. Возможно, что Vybrant-CM-Dil не просто концентрируется в макрофагах, а также окрашивает и их мембраны, в том числе и лизосомальные. Таким образом, макрофаги приобретают способность к флюоресценции при облучении их ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина. И это свечение может быть значительно более выраженным, чем у инъецированных АММСККП. Можно считать доказанным участие макрофагов в фагоцитозе, по крайней мере, части введенных в организм АММСККП.

Свечение макрофагов также возможно вследствие аутофлюоресценции [8, 9, 10] или из-за фагоцитоза веществ, обладающих свойством свечения при воздействии ультрафиолетового света, например, тех же эритроцитов и гемосидерина [3, 9, 11] из геморрагий в тканях и в самих ПЛУ. Но обнаруженное преимущественное свечение флюоресцирующих клеточных элементов с каким-то одним фильтром и менее интенсивное с другим не связано с

поглощением макрофагами клеток красной крови или продуктов их распада. Макрофаги и эритроциты в геморрагиях и в тканях в месте операции, и в ПЛУ светятся с одинаковой интенсивностью и при использовании фильтра Alexa 488, и при установке фильтра для родамина. Кроме того, в некоторых случаях, при наличии обширных кровоизлияний в паренхиму коркового вещества ПЛУ, там отсутствовали овальные скопления светящихся макрофагов. То есть образование или миграция флюоресцирующих клеточных элементов в корковое вещество ПЛУ, в том числе и на периферию лимфоидных узелков, не связаны с формированием кровоизлияний.

Возможно, что процесс макрофагального фагоцитоза АММСККП мог произойти непосредственно в тканях, в месте применения клеточных технологий. Затем макрофаги вместе с поглощенным антигеном мигрировали в ПЛУ пассивно или активно с током лимфы и выстроились (сконцентрировались) в лимфоидных узелках для инициации или активации клеточных элементов этих структур к делению и дифференцировке в плазматические клетки и синтезу ими определенных иммуноглобулинов к представленным фагоцитами антигенам.

Также существует вероятность, что детрит введенных АММСККП был фагоцитирован из лимфы макрофагами в самих ПЛУ или макрофаги из тканей передали антиген фагоцитам ПЛУ [12], расположенным на периферии лимфоидных узелков. Но в любом случае концентрация макрофагов с детритом АММСККП (не исключено, что и с другими антигенами) в лимфоидных узелках с большой долей вероятности свидетельствует о начале иммунных реакций. Кроме антигенов из самих АММСККП, видимо, возможно развитие иммунного ответа на какие-то антигены из тканей организма, сформированные в процессе их повреждения при хирургической травме.

Не исключено, что диффузная положительная реакция на антиген CD68 между клетками лимфоидного ряда в лимфоидных узелках обусловлена тем, что макрофаги — основная часть клетки — расположены вне (выше или ниже) плоскости среза, а реагируют с антителами против CD68 только отростки — выпячивания макрофагов, проникающие достаточно далеко между другими клеточными элементами.

По-видимому, АММСККП и их детрит частично проникают в кровеносное и лимфатическое русло только в лизосомах фагоцитов. Таким образом, возможно распределение АММСККП по всему организму и попадание, по крайней мере, в регионарные ПЛУ. В микро-

циркуляторных отделах, где тонкие и часто однослойные стенки, возможно захватывание периваскулярно расположенными макрофагами антигенных веществ из просвета сосудов, в том числе АММСККП и их окрашенного детрита. В результате содержащиеся рядом с сосудами макрофаги капсулы и паранодальных тканей ПЛУ тоже постепенно приобретают все большую возможность к флюоресценции при воздействии ультрафиолетовым светом с родаминовым фильтром.

Заключение

Таким образом, можно заключить, что введенные в ткани АММСККП с трансфицированным геном белка GFP частично фагоцитируются макрофагами в месте инъекции. Фагоцитоз АММСККП сопровождается быстрой деградацией протеина GFP, тогда как Vybrant-СМ-Dil, примененный для окрашивания мембран АММСККП, или не разрушается ферментами лизосом, или деградирует очень медленно. Происходит накопление этого красителя в макрофагах, в результате чего фагоциты приобретают способность к интенсивной флюоресценции при облучении их ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина. АММСККП и их фрагменты могут попадать в кровеносное и лимфатическое русло и оказываться, по крайней мере, в регионарных ПЛУ, возможно захватывание периваскулярными макрофагами АММСККП и их окрашенного детрита из просвета сосудов. В корковом веществе ПЛУ, на местах, соответствующих расположению лимфоидных узелков, после введения АММСККП в регион лимфосбора увеличивается как число и размер скопления крупных светящихся макрофагов, так и их количество в таких скоплениях. В некоторых фагоцитах содержатся специфически окрашенные фрагменты АММСККП, что может служить косвенным подтверждением высокой вероятности инициации гуморальной иммунной защиты против антигенов, введенных АММСККП.

Конфликт интересов отсутствует.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ ПФНИ ГАН на 2013-2020 гг. (VI.62.2.1, 0309-2016-0006) «Разработка технологий получения материалов для регенеративной медицины и развитие методов восстановления репродуктивного здоровья» и ПФИ 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».

ЛИТЕРАТУРА

1. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:643-75. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
2. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol.* 2016;17(1):9-17. doi: 10.1038/ni.3320.
3. Майбородин ИВ, Матвеева ВА, Маслов РВ, Оноприенко НВ, Кузнецова ИВ, Частикин ГА. Флуоресцирующие макрофаги в лимфатических узлах после применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с трансфицированным геном GFP. *Новости Хирургии.* 2014;22(5):526-32. doi: http://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2014.5.526.
4. Möllerherm H, Köckritz-Blickwede von M, Brantzi-ki-Heinemann K. Antimicrobial activity of mast cells: role and relevance of extracellular DNA traps. *Front Immunol.* 2016;7:265. doi: 10.3389/fimmu.2016.00265.
5. Pinke KH, Lima HG, Cunha FQ, Lara VS. Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1. *Immunobiology.* 2016 Feb;221(2):220-27. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.004.
6. Levin R, Grinstein S, Canton J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol Rev.* 2016 Sep;273(1):156-79. doi: 10.1111/imr.12439.
7. Naqvi AR, Fordham JB, Nares S. MicroRNA target Fc receptors to regulate Ab-dependent Ag uptake in primary macrophages and dendritic cells. *Innate Immun.* 2016 Oct;22(7):510-21. doi: 10.1177/1753425916661042.
8. Mendes-Jorge L, Ramos D, Luppo M, Llombart C, Alexandre-Pires G, Nacher V, et al. Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Dec;50(12):5997-6005. doi: 10.1167/iovs.09-3515.
9. Mitchell AJ, Pradel LC, Chasson L, Van Rooijen N, Grau GE, Hunt NH, et al. Technical advance: autofluorescence as a tool for myeloid cell analysis. *J Leukoc Biol.* 2010 Sep;88(3):597-603. doi: 10.1189/jlb.0310184.
10. Li F, Yang M, Wang L, Williamson I, Tian F, Qin M, et al. Autofluorescence contributes to false-positive intracellular Foxp3 staining in macrophages: a lesson learned from flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2012 Dec 14;386(1-2):101-7. doi: 10.1016/j.jim.2012.08.014.
11. Potter KA, Simon JS, Velagapudi B, Capadona JR. Reduction of autofluorescence at the microelectrode-cortical tissue interface improves antibody detection. *J Neurosci Methods.* 2012 Jan 15;203(1):96-105. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.09.024.
12. Гаврулин ВН, Шкурупий ВВ. Влияние накопления поливинилпирролидона в синусоидальных клетках печени на характер токсического повреждения органа. *Бюл СО РАМН.* 1995;(2):24-28.

REFERENCES

1. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:643-75. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
2. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol.* 2016;17(1):9-17. doi: 10.1038/ni.3320.

3. Maiborodin IV, Matveeva VA, Maslov RV, Onoprienko NV, Kuznetsova IV, Chastikin GA. Fluoresceinsirovushchie makrofagi v limfaticeskikh uzlakh posle primeneniia mul'tipotentnykh mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok s transfitsirovannym genom GFP [Fluorescent macrophages in the lymph nodes after the use of multipotent mesenchymal stromal cells with a transfected GFP gene]. *Novosti Khirurgii*. 2014;22(5):526-32. doi: <http://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2014.5.526>.
4. Möllerherm H, Köckritz-Blickwede von M, Branitzki-Heinemann K. Antimicrobial activity of mast cells: role and relevance of extracellular DNA traps. *Front Immunol*. 2016;7:265. doi: 10.3389/fimmu.2016.00265.
5. Pinke KH, Lima HG, Cunha FQ, Lara VS. Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1. *Immunobiology*. 2015 Feb;221(2):220-27. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.004.
6. Levin R, Grinstein S, Canton J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol Rev*. 2016 Sep;273(1):156-79. doi: 10.1111/imr.12439.
7. Naqvi AR, Fordham JB, Nares S. MicroRNA target Fc receptors to regulate Ab-dependent Ag uptake in primary macrophages and dendritic cells. *Innate Immun*. 2016 Oct;22(7):510-21. doi: 10.1177/1753425916661042.
8. Mendes-Jorge L, Ramos D, Luppo M, Llombart C, Alexandre-Pires G, Nacher V, et al. Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Dec;50(12):5997-6005. doi: 10.1167/iovs.09-3515.
9. Mitchell AJ, Pradel LC, Chasson L, Van Rooijen N, Grau GE, Hunt NH, et al. Technical advance: autofluorescence as a tool for myeloid cell analysis. *J Leukoc Biol*. 2010 Sep;88(3):597-603. doi: 10.1189/jlb.0310184.
10. Li F, Yang M, Wang L, Williamson I, Tian F, Qin M, et al. Autofluorescence contributes to false-positive intracellular Foxp3 staining in macrophages: a lesson learned from flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2012 Dec 14;386(1-2):101-7. doi: 10.1016/j.jim.2012.08.014.
11. Potter KA, Simon JS, Velagapudi B, Capadona JR. Reduction of autofluorescence at the microelectrode-cortical tissue interface improves antibody detection. *J Neurosci Methods*. 2012 Jan 15;203(1):96-105. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.09.024.
12. Gavrilin VN, Shkurupii VA. Vliianie nakopleniia polivinilpirrolidona v sinusoidal'nykh kletkakh pecheni na kharakter toksicheskogo povrezhdeniia organa [The effect of the accumulation of polyvinyl pyrrolidone in sinusoidal liver cells on the nature of toxic organ damage]. *Biul SO RAMN*. 1995;(2):24-28.

Адрес для корреспонденции

Российская Федерация,
г. Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, д. 8,
ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН,
лаборатория стволовой клетки,
тел.: 8-913-753-07-67,
e-mail: imai@mail.ru,
Майбородин Игорь Валентинович

Сведения об авторах

Майбородин И.В., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории стволовой клетки ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН.
Морозов В.В., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией инвазивных медицинских технологий ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН.
Аникеев А.А., к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки ИХБФМ СО РАН.
Фигуренко Н.Ф., к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН.
Маслов Роман Владимирович, к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки ИХБФМ СО РАН.
Частикин Г.А., к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН.
Матвеева В.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории стволовой клетки ИХБФМ СО РАН.
Майбородина В.И., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных основ патологии ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии».

Address for correspondence

630090, Russian Federation, Novosibirsk,
Acad. Lavrentiev Ave 8,
FSBES «Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the SB RAS, stem cell laboratory
Tel.: 8-913-753-07-67,
E-mail: imai@mail.ru,
Igor V. Maiborodin

Information about the authors

Maiborodin I.V. MD, Professor, Chief researcher of the stem cell laboratory of FSBES “Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine”, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.
Morozov V.V. MD, Professor, Head of laboratory of invasive medical technologies, FSBES “Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine”, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.
Anikeev A.A. PhD, applicant for Doctor’s degree of FSBES “Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine”, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.
Figurenko N.F. PhD, Applicant for Doctor’s degree of the stem cell laboratory, FSBES “Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine”, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.
Maslov R.V. PhD, Applicant for Doctor’s degree of the stem cell laboratory, FSBES “Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine”, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.
Chastikin G.A. PhD, Applicant for Doctor’s degree of the stem cell laboratory, FSBES “Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine”, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.
Matveeva V.A. PhD (Biology), Senior Researcher of

the stem cell laboratory, FSBES “Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine”, the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch.

Maiborodina V.I. MD, Leading Researcher of the laboratory of pathology ultrastructural foundations, FSBES “Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology”.

Информация о статье

*Поступила 27 декабря 2016 г.
Принята в печать 6 февраля 2017 г.
Доступна на сайте 4 мая 2017 г.*

Article history

*Received 27 December 2016
Accepted 6 February 2017
Available online 4 May 2017*
