

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-2-128-139

## ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННОГО И КСЕНОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ МАКРОФАГОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

В.Н. Павлов, А.И. Лебедева, К.В. Данилко, О.Р. Шангина

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Российская Федерация

**Актуальность.** Определение биосовместимых свойств биотрансплантатов является актуальной проблемой для тканевой инженерии. Продукты их деградации вызывают различные клеточные реакции, влияющие на исход заживления. Макрофаги определяют биосовместимые свойства и эффективность процесса регенерации. Задачей исследования явилось выявление особенностей клеточного состава и репертуара макрофагов, обусловленного экзогенным аллогенным и ксеногенным матриксом. **Цель:** выявление морфофункционального профиля макрофагов *in vitro* и *in vivo* после алло- и ксенотрансплантации. **Материалы и методы.** *In vitro* моноциты донора культивировали 7 суток на подложке из губчатого и суспензии диспергированного аллогенных биоматериалов из серии «Аллоплант®», изготовленных из кадаверной ткани человека. *In vivo* беспородным крысам – самцам массой 200–250 г (n = 20) подкожно вводили суспензию (10 мг) диспергированного аллогенного биоматериала (ДАБ), изготовленного из сухожилий крыс и ксеногенного биоматериала (ДКБ) из сухожилий кролика. Спустя 7 и 14 суток иссекали зону трансплантата. Проводили морфологические исследования: гистологические, иммуногистохимические (VEGF-R1, CD206, CD86, TNF- $\alpha$ , CD163, TGF- $\beta$ , CD68, FGF-1, MMP-9, TIMP-2, HLA-DR), сканирующую электронную микроскопию. **Результаты.** *In vitro* моноциты приобретали морфологию зрелых макрофагов с фенотипом CD68<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>, VEGF-R<sup>+</sup> и CD86<sup>-</sup>, TGF- $\beta$ <sup>-</sup>, CD163<sup>-</sup>, FGF-1<sup>-</sup>, MMP-9<sup>-</sup>, TIMP-2<sup>-</sup>. *In vivo* ДАБ лизировался с высвобождением гликозаминогликанов (ГАГ), резорбировался, замещался без признаков инкапсуляции макрофагами фенотипов: M1 (CD86<sup>+</sup>) и M2 (CD206<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup>), VEGF-R<sup>+</sup> и TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. При этом они были TGF- $\beta$ <sup>-</sup> и HLA DR<sup>-</sup> негативны. После введения ДКБ наблюдались признаки инкапсуляции биоматериала, гранулематозное воспаление, ГАГ не выявлялись. Макрофаги определялись с фенотипом M2 (CD206<sup>+</sup>), TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> и TNF- $\alpha$ <sup>-</sup>, VEGF-R<sup>-</sup>. **Заключение.** Видовая специфичность биоматериалов определяет фенотип макрофагов, клеточную реакцию и исход заживления. Аллобиоматериал резорбировался и замещался структурно полноценным регенератом. Макрофаги различных фенотипов – M1 и M2 – не проявляли антигенных и фиброгенных свойств, стимулировали ангиогенез. Ксенобиоматериал вызывал хроническое воспаление и инкапсуляцию. Выявлялись только M2-макрофаги с антигенными, фиброгенными свойствами.

*Ключевые слова:* аллогенный биоматериал, ксеногенный биоматериал, моноциты, макрофаги, цитокины, факторы роста.

## EFFECTS OF ALLOGENEIC AND XENOGENEIC BIOMATERIALS ON MACROPHAGE MORPHOLOGY AND FUNCTION *IN VITRO* AND *IN VIVO*

V.N. Pavlov, A.I. Lebedeva, K.V. Danilko, O.R. Shangina

Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

**Background.** Determining the biocompatibility of biotransplants remains a pressing issue in tissue engineering. The degradation products of these materials elicit diverse cellular responses that ultimately influence healing outcomes. Among these responses, macrophages play a central role in regulating biocompatibility and guiding the regenerative process. **Objective:** to characterize the cellular composition and repertoire of macrophages

**Для корреспонденции:** Лебедева Анна Ивановна. Адрес: 450075, Уфа, ул. Рихарда Зорге, д. 67/1. Тел. (903) 351-02-07. E-mail: Jeol02@mail.ru

**Corresponding author:** Anna Lebedeva. Address: 67/1, Richard Sorge str., Ufa, 450075, Russian Federation. Phone: (903) 351-02-07. E-mail: Jeol02@mail.ru

induced by exogenous allogeneic and xenogeneic matrices, and to determine the morphofunctional profile of macrophages *in vitro* and *in vivo* following allogeneic and xenogeneic transplantation. **Materials and methods.** *In vitro*, donor-derived monocytes were cultured for 7 days on a substrate composed of a sponge matrix and a suspension of dispersed allogeneic biomaterials from the Alloplant® series, obtained from human cadaver tissue. *In vivo*, male outbred rats (200–250 g; n = 20) received subcutaneous injections of a suspension (10 mg) of dispersed allogeneic biomaterial (DAB) derived from rat tendons, and dispersed xenogeneic biomaterial (DXB) derived from rabbit tendons. Transplantation sites were excised at 7 and 14 days post-implantation. Morphological evaluation included histological and immunohistochemical analyses (VEGF-R1, CD206, CD86, TNF- $\alpha$ , CD163, TGF- $\beta$ , CD68, FGF-1, MMP-9, TIMP-2, HLA-DR), as well as scanning electron microscopy. **Results.** *In vitro*, monocytes differentiated into mature macrophages exhibiting the following phenotype: CD68<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>, VEGF-R<sup>+</sup>, CD86<sup>-</sup>, TGF- $\beta$ <sup>-</sup>, CD163<sup>-</sup>, FGF-1<sup>-</sup>, MMP-9<sup>-</sup>, and TIMP-2<sup>-</sup>. *In vivo*, DAB underwent lysis with the release of glycosaminoglycans (GAG), followed by resorption and replacement without evidence of encapsulation by macrophages of the following phenotypes: M1 (CD86<sup>+</sup>) and M2 (CD206<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>), as well as VEGF-R<sup>+</sup> and TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> expression, while remaining negative for TGF- $\beta$  and HLA-DR. In contrast, DXB induced encapsulation and granulomatous inflammation, with no detectable GAG release. Macrophages in this group predominantly exhibited an M2 phenotype (CD206<sup>+</sup>), with positive expression of TGF- $\beta$  and HLA-DR, and negative expression of TNF- $\alpha$  and VEGF-R. **Conclusion.** The species specificity of biomaterials determines macrophage phenotype, cellular response, and healing outcomes. Allogeneic biomaterial was effectively resorbed and replaced by structurally complete regenerative tissue. Macrophages of both M1 and M2 phenotypes did not demonstrate antigenic or fibrogenic activity and promoted angiogenesis. In contrast, xenogeneic biomaterial elicited chronic inflammation and encapsulation, characterized by the presence of M2 macrophages with antigenic and fibrogenic properties.

*Keywords:* allogeneic biomaterial, xenogeneic biomaterial, monocytes, macrophages, cytokines, growth factors.

## ВВЕДЕНИЕ

В области регенеративной медицины одним из направлений является использование экстраклеточного децеллюляризованного матрикса для восстановления тканей и органов. Его применяют для создания тканеинженерных конструкций в качестве скаффолдов для культивирования клеточных культур, а также как самостоятельное фармакологическое средство. В медицине используют как аллогенные, так и ксеногенные биоразлагаемые материалы на основе внеклеточного матрикса в равной степени. Ксеногенный биоматериал является распространенным и доступным, дешевым сырьем для массового производства [1]. Поэтому определение биосовместимых свойств трансплантатов представляет актуальную проблему. Продукты их биодegradации вызывают различного рода клеточные реакции, которые могут повлиять на исход заживления [2]. Макрофаги служат первой ступенью иммунной реакции в ответ на имплантацию биоматериалов, определяют их биосовместимые свойства, являются гетерогенной, мультифункциональной клеточной популяцией. Они определяют дальнейшее направление, течение каскада клеточных реакций и эффективность процесса регенерации [3].

Известно, что макрофаги подразделяются на провоспалительные (M1), неактивированные (M0) и противовоспалительные (M2) субпопуляции, которые играют разные роли в инициации и разрешении воспаления. Неактивированные («наивные», интактные) M0-макрофаги поляризуются при различных

условиях, превращаясь либо в макрофаги M1, либо в макрофаги M2. Поляризация макрофагов происходит под контролем различных программ активации метаболизма аргинина в клетках [4]. Факторы, определяющие, какой путь активации будет являться доминирующим, основаны на окружающих сигналах, которым подвергаются макрофаги, и доступном пуле аргинина [5]. Фенотипически макрофаги M1 характеризуются высокой экспрессией MHC II (HLA-DR), CD80 и CD86, CD64, CD32, iNOS [6]. Кроме этого, M1 отличаются экспрессией TLR4 и TLR2, секрецией IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  [7]. M1-макрофаги обеспечивают воспалительный процесс благодаря широкому спектру секреторируемых ими функциональных молекул: цитокинов, факторов роста. Функционально M2-макрофаги способствуют ремоделированию тканей и отличаются сильной способностью к фагоцитозу, индуцируют фиброз, ангиогенез, васкулогенез, способствуют опухолевой прогрессии [8]. Ранозаживляющие или репаративные макрофаги составляют группу клеток, которые, как и классически активированные макрофаги, возникают в результате задействования врожденных или адаптивных сигнальных механизмов. Однако M2-клетки больше связаны с восстановлением, чем с защитой [3, 8]. Хотя заживление ран, как правило, полезно, но при нарушении регуляции активности макрофагов при заживлении ран может возникнуть фиброз ткани [9].

Роль макрофагов и их поляриность, индуцированная децеллюляризованным внеклеточным матриксом различного происхождения, изучены недоста-

точно. Задачей исследования явилось определение особенностей клеточного состава, а также репертуара макрофагов в условиях различного микроокружения, обусловленного экзогенным экстрацеллюлярным матриксом аллогенного и ксеногенного происхождения. Цель исследования: определение морфофункционального профиля макрофагов *in vitro* и *in vivo* после алло- и ксенотрансплантации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этапы проведения эксперимента включали: определение морфологических особенностей моноцитов, культивируемых на аллогенном губчатом и диспергированном экстраклеточном матриксе; проведение сравнительного анализа клеточных реакций на губчатый и диспергированный экстраклеточный матрикс и экспрессии цитокинов и ростовых факторов VEGF-R1, CD206, CD86, TNF- $\alpha$ , CD163, TGF- $\beta$ , CD68, FGF-1, MMP-9, TIMP-2, HLA-DR через 7 и 14 суток после подкожного введения аллогенного и ксеногенного биоматериалов.

Для исследования *in vitro*: в качестве скаффолда для культивирования клеток применили аллогенные биоматериалы серии «Аллоплант®», изготовленные из волокнистой соединительной кадаверной ткани человека. Их подвергали механической и химической обработке (децеллюляризации), исходя из лабораторного регламента ТУ 9398-001-04537642-2011. Далее обработанный биоматериал замораживали до  $-60^{\circ}\text{C}$  и высушивали под вакуумом до остаточной влажности 8–10% на лиофильной установке BIOBASE BK-FD30S. Губчатый аллогенный биоматериал (ГАБМ) моделировали трепаном диаметром 0,5 см (под размер лунки 96-луночного планшета). Диспергированный аллогенный биоматериал (ДАБ) состоял из измельченных до размера 50–80 мкм частиц. Затем биоматериалы помещали в 96-луночный планшет. Стерилизацию планшетов с образцами осуществляли ионизирующим излучением дозой 1,5 Мрад (15 кГр) на радиационно-технологическом комплексе ЛУ-7-2.

Перед внесением клеток ГАБМ смачивали 150 мкл культуральной среды без сыворотки в течение 30–60 минут. ДАБ из одного флакона разбавляли 800 мкл полной культуральной среды и добавляли в лунки планшета по 30–50 мкл. Культуральная среда: RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) + 10% FBS (Capricorn, Германия) + 2% глутамин 200 мМ (Himedia, Индия).

Моноциты изолировали из 30–40 мл периферической крови донора. Кровь из пробирок с K2 ЭДТА смешивали в стерильных флаконах с фосфатным солевым буфером без кальция и магния (PBS, Биолот, Россия) в соотношении 1 : 1 по объему. Полученную суспензию наносили на поверхность слоя фиколла плотностью 1,077 (ПанЭко, Россия) и центрифугировали 30 мин при 420 g. Клетки из белого интерфазного слоя градиента фиколла аккуратно собирали и

промывали дважды раствором PBS. После подсчета клеток на автоматическом счетчике (TC20, BioRad, США) смешивали их с суспензией CD14<sup>+</sup> магнитных частиц (Miltenyi Biotech's monocyte isolation kit, Bergisch Gladbach, Германия) и проводили сортировку клеток с помощью магнитного штатива. Моноциты подсчитывали на счетчике клеток TC20 и анализировали с помощью проточного цитометра (Novocyte 3000, Agilent, США) для контроля их чистоты. Чистота составила 91% CD14<sup>+</sup>-клеток.

Моноциты разводили в полной культуральной среде из расчета 1000 клеток в 50 мкл и вносили на поверхность ГАБМ и ДАБ, использовали по 4 лунки для каждого материала. Длительность культивирования моноцитов на биоматериалах составила 7 суток.

Для исследований *in vivo* применяли беспородных крыс-самцов массой 200–250 г в количестве 20 голов. На одну точку исследований использовали по 5 животных. Суспензию ДАБ в количестве 10 мг вводили подкожно в область спины, предварительно разведя физиологическим раствором ( $n = 10$ ). ДАБ из сухожилий крыс был порошкообразной формы. Ксенотрансплантацию крысам ( $n = 10$ ) проводили диспергированным ксеногенным биоматериалом (ДКБ), изготовленным из сухожилий кролика. ДАБ и ДКБ изготавливались также согласно ТУ 9398-001-04537642-2011. Крыс содержали в пластиковых клетках при естественном освещении и температуре 22–24  $^{\circ}\text{C}$ , кормили брикетированными комбикормами. Вода подавалась без ограничений. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с принципами, утвержденными этическим комитетом при ФГБОУ ВО «БГМУ» Минздрава России, протокол № 63 от 22.08.2022 г. (Уфа, Россия) и установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [10]. Спустя 7 и 14 суток животных выводили из эксперимента путем передозировки ингаляционного анестетика – эфира, иссекали ткани – зону трансплантата с окружающими тканями – и подвергали морфологическому исследованию.

Для морфологического исследования кусочки ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Хейлу (выявление суммарной фракции гликозаминогликанов). Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD 108 (Leica, Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Для электронно-микроскопического исследования с помощью установки «Fine coat ion sputter JFC

1100» (Jeol, Япония) исследуемые образцы были подвергнуты сушке. Затем в этой же установке проходило катодное напыление на исследуемую поверхность образцов токопроводящего материала. Использовали сканирующий растровый электронный микроскоп Tescan Vega-3SBH с вольфрамовым термокатодом при ускоряющем напряжении 5 кВ (Чехия).

Для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Leica, Германия). Для окрашивания использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND Polymer Refine Detection (Novocastra™, Германия).

Первичные антитела указаны в таблице.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании *in vitro* при сканировании поверхности ГАБМ выявлялись разнонаправленные пучки коллагеновых волокон первого и второго порядка. Направление волокон было разносторонним. Определялись эластические волокна в виде уплощенных лентообразных структур. На поверхности биоматериала определялись редко расположенные клетки (рис. 1, а). Поверхность моноцитов приобретала неровный вид. Цитолемма выявлялась с выраженными инвагинациями – характерной бугристой по-

Таблица  
Перечень используемых первичных антител  
List of primary antibodies used

№	Первичное антитело	Разведение	Производитель
1	VEGF-R1	1 : 100	Elabscience (КНР)
2	CD206	1 : 100	Elabscience (КНР)
3	CD86	1 : 50	Elabscience (КНР)
4	TNF- $\alpha$	1 : 200	Ab clonal (США)
5	CD163	1 : 50	Ab clonal (США)
6	TGF- $\beta$	1 : 300	Ab clonal (США)
7	CD68	1 : 300	Santa cruz (США)
8	FGF-1	1 : 300	Santa cruz (США)
9	MMP-9	1 : 100	Affinity Biosciences (КНР)
10	TIMP-2	1 : 200	Santa cruz (США)
11	HLA-DR	1 : 300	Santa cruz (США)

верхностью и складками. Клетки формировали филоподии, за счет которых они были прикреплены к матриксу (рис. 1, б). Следовательно, после пересадки моноцитов на подложку из аллогенного биоматериала клетки приобретали морфологию зрелых макрофагов с изменением формы, клеточной поверхности [11].

Морфология макрофагов в условиях *in vitro* выглядела как прикрепившиеся клетки с типичной структурой: неровной инвагинированной поверх-

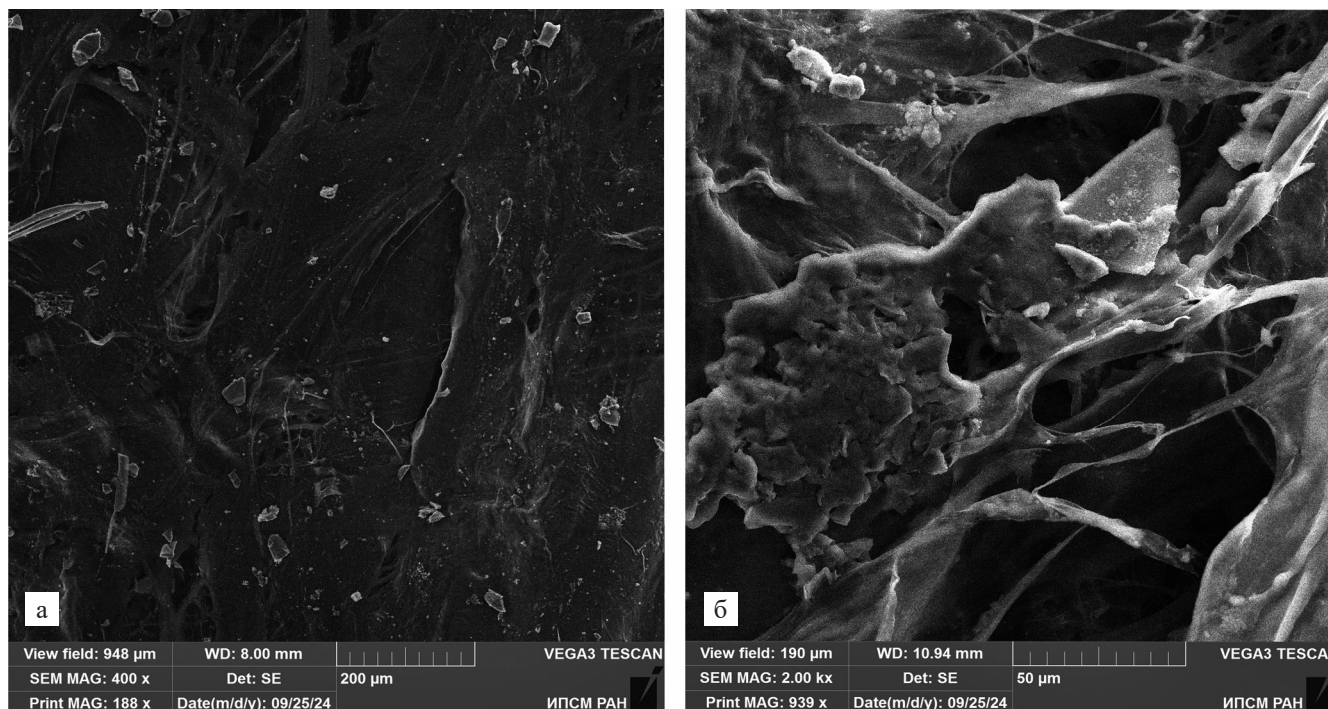


Рис. 1. Аллогенный губчатый биоматериал и моноциты: а – редкое расположение клеток на поверхности аллогенного губчатого трансплантата; б – складчатая поверхность морфологии моноцита. Электронные сканограммы

Fig. 1. Allogeneic spongy biomaterial and monocytes; а – sparse distribution of cells on the surface of the allogeneic spongy graft; б – folded surface morphology of a monocyte. Scanning electron micrographs

ностью, множественными выростами цитоплазмы и многочисленными псевдоподиями для удержания клеток на субстрате.

Моноциты после культивирования на ДАБ позитивно окрашивались на CD68, CD206, VEGF-R. Реакция с антителами CD86, TGF-β, CD163, FGF-1, MMP-9, TIMP-2 была негативной (рис. 2).

Моноциты трансформировались в макрофаги M2-популяции, т. к. были позитивны к CD68- и CD206-антигенам и экспрессировали VEGF-R. Факторы, на основании которых клетки можно было бы отнести к M1-макрофагам (CD86), отсутствовали. Профиброгенные факторы TGF-β, FGF-1, MMP-9 также были отрицательны. Следовательно, моноциты при культивировании на аллогенном биоматериале трансформировались в макрофаги с противои фибротическими свойствами и ангиогенным потенциалом.

Помимо подложки, представленной экстраклеточным матриксом, различные факторы микроокружения живого организма могут оказывать влияние

на фенотип макрофагов и моделировать клеточную реакцию, которая представлена в эксперименте *in vivo*. Спустя 7 суток после подкожного введения ДАБ частицы трансплантата набухали, возле них выявлялись многочисленные макрофаги, определялись сосудистые почки – тяжи эндотелиоцитов, единичные гемокапилляры с форменными элементами крови в просветах. Стенка сосудов была тонкая, выстлана эндотелиоцитами, располагающимися на базальной мембране, перициты отсутствовали (рис. 3, а).

Через 14 суток в зоне имплантации определялась макрофагально-мезенхимная реакция, фибробластические клетки. Выявлялись многочисленные кровеносные сосуды: гемокапилляры и дифференцированные сосуды артериального и венозного русла. Стенка была выстлана эндотелиоцитами, в венозных сосудах определялся высокий эндотелий. Возле базальной мембраны располагались перициты. В просвете сосудов находились эритроциты. Явлений стаза и сладжа форменных элементов крови не наблюда-

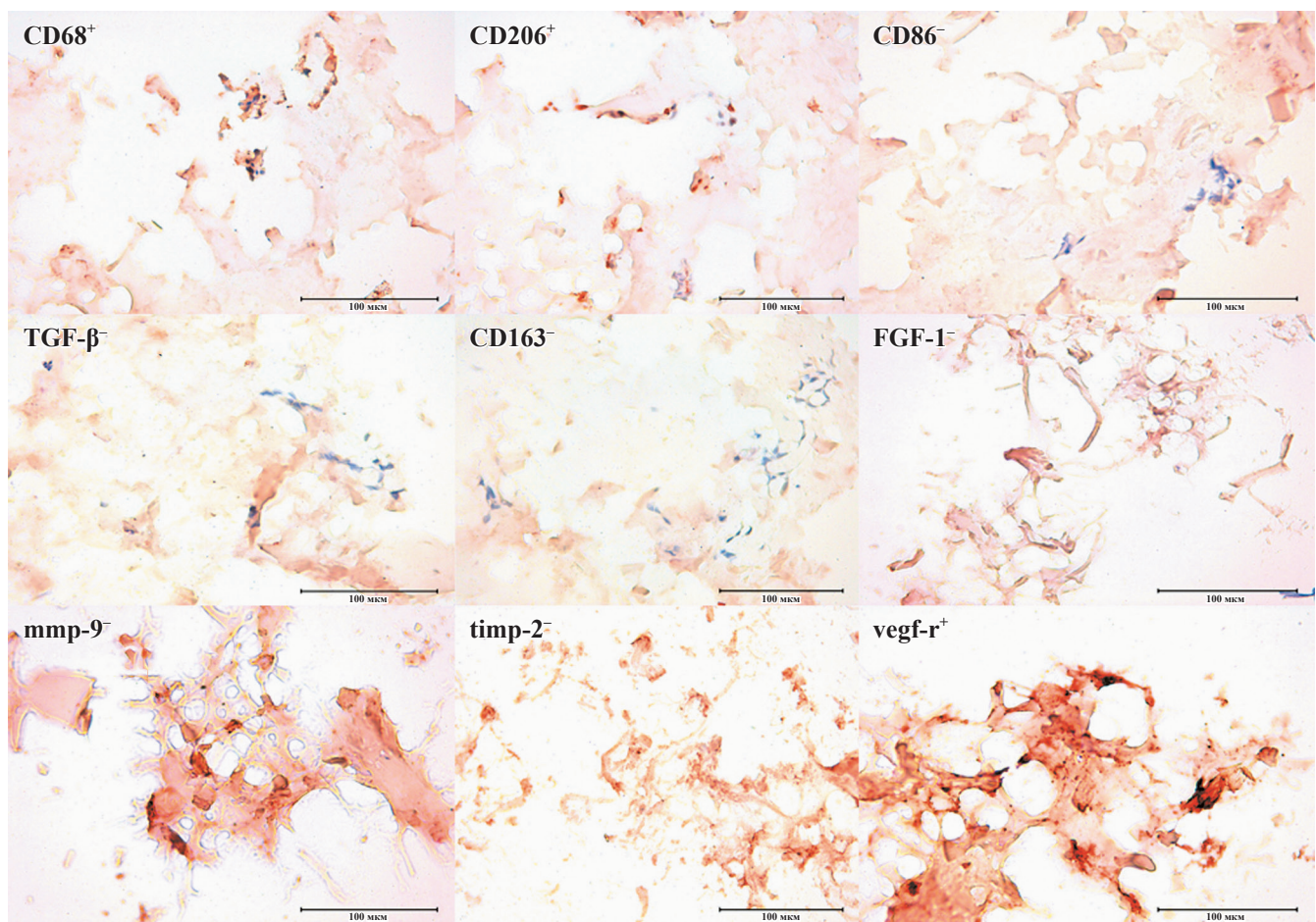


Рис. 2. Факторы роста и цитокины моноцитов, культивированных на ДАБ. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления антигенов с докраской гематоксилином на парафиновых срезах. «+» – позитивная реакция, «-» – негативная реакция

Fig. 2. Growth factors and cytokines in monocytes cultured on DAB. Indirect immunoperoxidase staining for antigen detection with hematoxylin counterstaining in paraffin-embedded sections. Positive staining is indicated by «+», and absence of staining by «-»

лось. Частицы ДАБ лизировались, резорбировались макрофагами и замещались тонкими коллагеновыми волокнами. Формировался васкуляризированный регенерат, представленный рыхлой волокнистой соединительной тканью (рис. 3, б). При окраске по Хейлу частицы ДАБ и цитоплазма макрофагов окрашивались в интенсивный синий цвет, что указывало на наличие гликозаминогликанов (ГАГ) – рис. 3, в. Частицы биоматериала подвергались набуханию и лизису со стороны макрофагов. При окраске по Ван-Гизону их тинкториальные свойства менялись, определялись признаки пикринофилии. Инкапсуляции не наблюдалось (рис. 3, г).

При оценке клеточной реакции *in vivo* в нашей работе замечено, что после аллотрансплантации в ранние сроки (7 суток) частицы биоматериала подвергались лизису, инфильтрации и резорбции

макрофагами, индуцировали неоангиогенез. Сосуды прорастали со стороны окружающих тканей. Со временем определялась макрофагально-мезенхимная реакция с наличием многочисленных дифференцированных кровеносных сосудов, умеренный или неактивный коллагеногенез. Высокий эндотелий венозных сосудов указывает на признаки активации трансэндотелиальных процессов. Наличие ГАГ и их последующий синтез макрофагами в зоне регенерации связан с синтезом углеводного компонента внеклеточного матрикса, определяющего зрелость коллагеновых волокон соединительно-тканых прослоек. ГАГ создают гомеостаз в очаге замещения реактивной зоны и играют структурно-информативную роль для клеточных коопераций [12]. С дефицитом ГАГ связывают развитие избыточного коллагеногенеза и формирование рубца. ГАГ определяют стро-

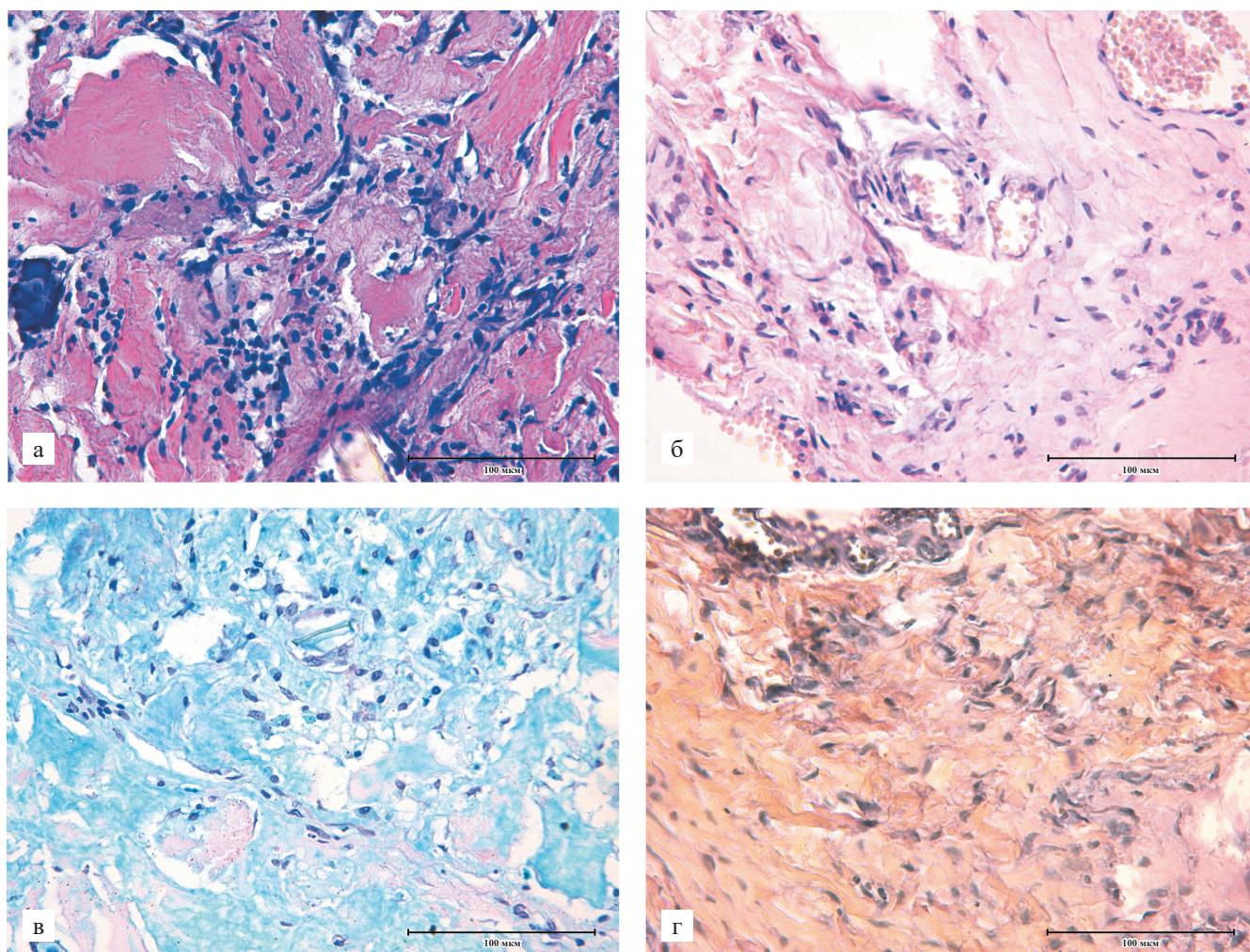


Рис. 3. Клеточная реакция вокруг частиц аллогенного биоматериала *in vivo*: а – макрофагальная реакция через 7 суток, окраска гематоксилином и эозином; б – кровеносные сосуды через 14 суток, окраска гематоксилином и эозином; в – гликозаминоглюканы через 14 суток, окраска по Хейлу; г – лизис и набухание коллагена, пикринофилия через 14 суток, окраска по Ван-Гизону

Fig. 3. Cellular response around particles of allogeneic biomaterial *in vivo*: а – macrophage response at 7 days, H&E stain; б – blood vessels at 14 days, H&E stain; в – glycosaminoglycans at 14 days, Hale's colloidal iron stain; г – lysis and swelling of collagen at 14 days, Van Gieson stain

мально-клеточные взаимодействия и эффективность заживления соединительной ткани [13]. ГАГ в составе протеогликанов соединительной ткани обеспечивают ее механические свойства, участвуют в репаративных процессах иммунного ответа, выполняют трофическую и антиоксидантную функции, играют активную роль в воспалительных реакциях и других патологических состояниях. Функционально ГАГ в соединительной ткани участвуют в синтезе зрелых коллагеновых и эластиновых волокон, определяют их качественные и количественные свойства [14]. Можно предположить, что биодegradация ДАБ, выявленная в данном исследовании, заключается в высвобождении связанных ГАГ и в последующем синтезе их макрофагами.

Спустя 7 суток после подкожного введения ДКБ наблюдались признаки инкапсуляции биоматериала.

По периферии введенного биоматериала формировалась плотная волокнистая соединительная ткань, представленная коллагеновыми волокнами и фибробластическими клетками, встречались лимфоциты. Макрофаги и фибробласты инфильтрировали частицы ксеноматериала, причем макрофаги образовывали многоклеточные формы (рис. 4, а).

Спустя 14 суток клеточная плотность макрофагов и фибробластов нарастала. Макрофаги трансформировались в эпителиоидные и гигантские клетки инородных тел, кровеносных сосудов не обнаруживалось, а плотные коллагеновые волокна разрастались в зоне имплантации (рис. 4, б). ГАГ практически не выявлялись (рис. 4, в). При окраске по Ван-Гизону тинкториальные свойства не изменялись, определялась фуксинофилия (рис. 4, г). Следовательно, резорбция ксенобиоматериала была затруднена.

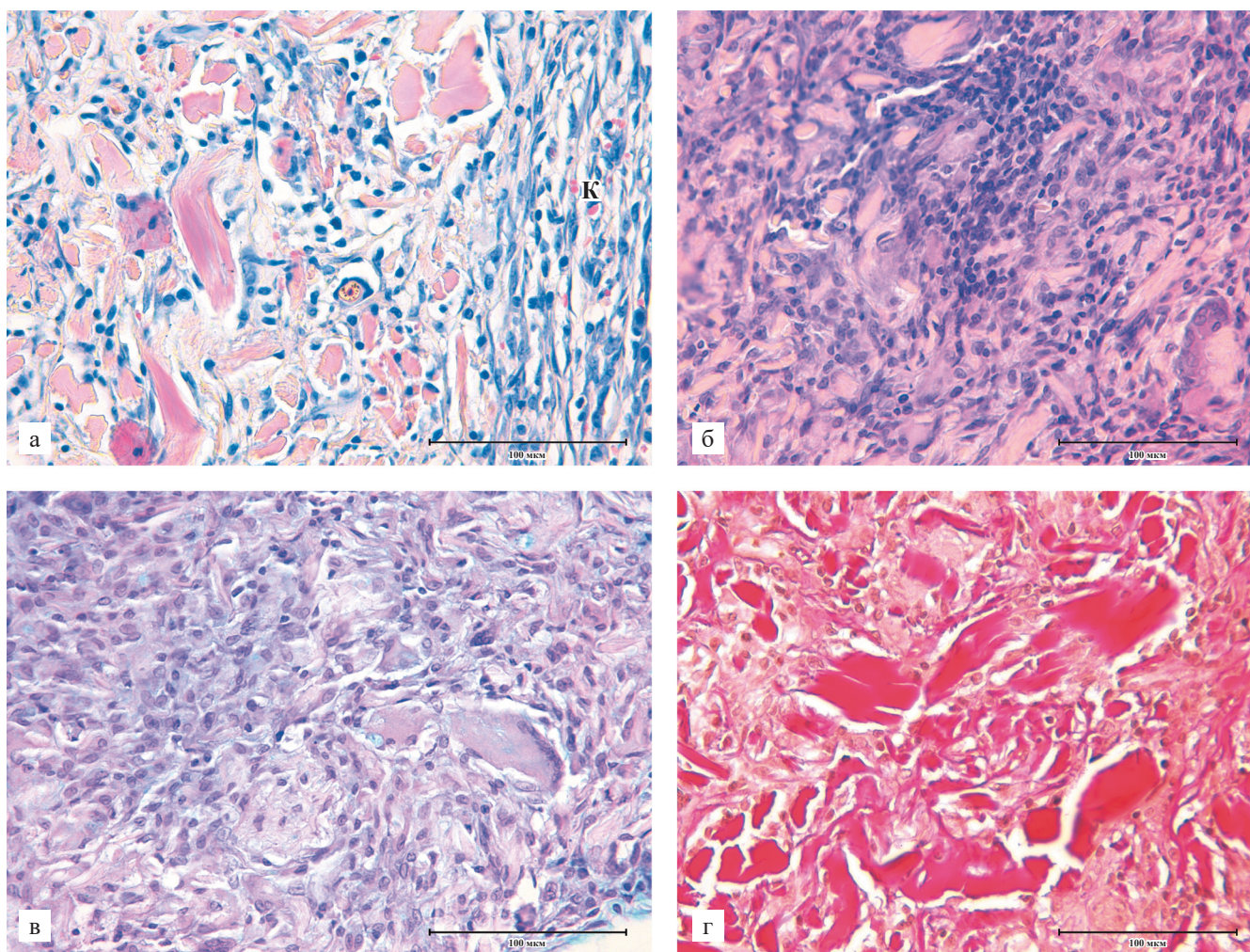


Рис. 4. Клеточная реакция после введения ксеногенного биоматериала *in vivo*: а – клеточный вал, соединительнотканная капсула (К) через 7 суток, окраска гематоксилином и эозином; б – гранулемы вокруг частиц ксеногенного биоматериала через 14 суток, окраска гематоксилином и эозином; в – отсутствие ГАГ через 14 суток, окраска по Хейлу; г – фуксинофилия частиц биоматериала через 14 суток, окраска по Ван-Гизону

Fig. 4. Cellular response following *in vivo* administration of xenogenic biomaterial: а – cell wall, connective tissue capsule (K) at 7 days, H&E stain; б – granulomas around xenogenic biomaterial particles at 14 days, H&E stain; в – absence of glycosaminoglycans at 14 days, Hale's colloidal iron stain; г – fuchsinophilia of biomaterial particles at 14 days, Van Gieson stain

После ксенотрансплантации макрофагальная реакция была более выражена, клетки накапливались, увеличивался объем их цитоплазмы, они сливались и формировали гигантские клетки инородных тел через стадию эпителиоидных клеток. Наряду с макрофагами мигрировали фибробластические клетки, которые проникали между частицами ксеноматериала, а также образовывали аваскулярную плотную соединительно-тканную капсулу вокруг ДКБ, чтобы ограничить трансплантат от окружающих тканей. Формировалось гранулематозное воспаление. ГАГ не обнаруживались, частицы ДКБ слабо деградировали.

Так, несмотря на выраженную макрофагальную реакцию, после алло- и ксенотрансплантации определялись радикальные различия в заживлении и интеграции биоматериалов. Выявление фенотипических свойств макрофагальных клеток может служить предиктором тканевой регенерации и осложнений.

При иммуногистохимическом исследовании ряда антигенов определялись качественные межгрупповые различия. Среди многообразия макрофагальных клеток с различной полярностью после введения ДАБ определялись CD86-макрофаги, относящиеся к M1-макрофагам, с провоспалительной активностью на протяжении 7–14 суток, в то время как после имплантации ДКБ подобные клетки не обнаруживались. M2-макрофаги (CD206) также определялись после введения ДАБ и ДКБ. CD163-макрофаги наблюдались в обоих экспериментах, но спустя 14 суток после введения ДКБ подобные клетки не обнаруживались. Клетки, позитивно окрашивающиеся к антигенам MMP-9 и их ингибиторам TIMP-2, определялись во всех видах и сроках экспериментов. Но численность MMP-9<sup>+</sup>-клеток явно преобладала по отношению к TIMP-2<sup>+</sup>-клеткам после имплантации ДКБ. Фактор роста TGF-β<sup>+</sup> в клетках после введения ДАБ не обнаруживался вовсе, в то время как после введения ДКБ подобные клетки наблюдались на протяжении всего эксперимента. TNF-α<sup>+</sup>-клетки и VEGF-R<sup>+</sup>-клетки определялись после введения ДАБ спустя 7 и 14 суток, а после введения ДКБ наблюдались только в начальные сроки (7 суток), через 14 суток не обнаруживались. HLA-DR<sup>+</sup>-антиген определялся только в макрофагах, индуцированных ДКБ, во всех сроках наблюдения. Аллогенный биоматериал не стимулировал экспрессию HLA-DR в макрофагах (рис. 5).

При анализе фенотипа макрофагов выявлено, что после введения ДАБ присутствуют макрофаги обеих полярностей – M1 и M2. Наличие макрофагов M1 (CD86) сопряжено с экспрессией TNF-α, что было обнаружено в данном эксперименте. Это свидетельствует о провоспалительной направленности клеток, активации фагоцитарного процесса, резорбции и биодеградации биоматериала. Макрофаги M2 с регуляторным и противовоспалительным фенотипом сдерживают острое воспаление и спо-

собствуют заживлению, ремоделированию тканей. Об антифиброгенном действии ДАБ-индуцированных макрофагов свидетельствует отсутствие TGF-β (*in vivo* / *in vitro*) и FGF-1 (*in vivo*) антигенов. Они также высоко фагоцитарны и продуцируют компоненты внеклеточного матрикса, ангиогенные факторы VEGF-R и стимулируют рост кровеносных сосудов. Также M2-макрофаги способствуют интеграции биоматериала, а гигантские клетки инородных тел – фиброзу [15].

Известно, что индукция резидентных или мигрирующих макрофагов в очаге поражения в фенотип M2 может продлить присутствие биоматериала в ткани. Уменьшенная деградация и увеличенное количество M2 могут, кроме того, иметь профиброзный и рубцовый эффект, что нежелательно. Поэтому следует проявлять осторожность, когда речь идет о стимуляции макрофагов в фенотип M2 вокруг разлагаемых биоматериалов [16]. В целом роль макрофагов в адекватной индукции резорбции трансплантата и ремоделировании ткани может быть связана с дисбалансом между макрофагами M1 и M2.

Важной функцией всех макрофагов является захват и презентация антигена, и таким образом, связывание врожденного и адаптивного иммунитета. Макрофаги способны представлять антиген в воспаленной области и таким образом усиливать реакцию T-лимфоцитов, уже подготовленных в лимфатических узлах [17]. Макрофаги M1 теперь рассматриваются как необходимые при начальном воспалении для правильной интеграции недеградируемых биоматериалов и желаемые для деградации деградируемых биоматериалов. С другой стороны, макрофаги M2 в настоящее время рассматриваются как желаемая [18] популяция клеток вокруг деградируемых и недеградируемых имплантатов.

Выявлено, что после введения ДКБ обнаруживались только CD206-макрофаги, из которых могут происходить гигантские клетки инородных тел [19], что и было показано в данном исследовании. Они появляются в ответ на плохо перевариваемые, макромолекулярные чужеродные материалы на границе инородных материалов [20]. Но ключевым отличительным признаком ДКБ-индуцированных макрофагов служит экспрессия на их поверхности HLA-DR [21]. HLA-DR является важным маркером макрофагов для контроля иммунологических реакций и презентации антигенов в реакциях, опосредованных T-клетками. Это может способствовать развитию реакций гиперчувствительности замедленного действия, развитию хронического воспаления в ткани, фиброзу [22], что определено в данном эксперименте.

Природа биологического материала является ключевым фактором поляризации макрофагов.

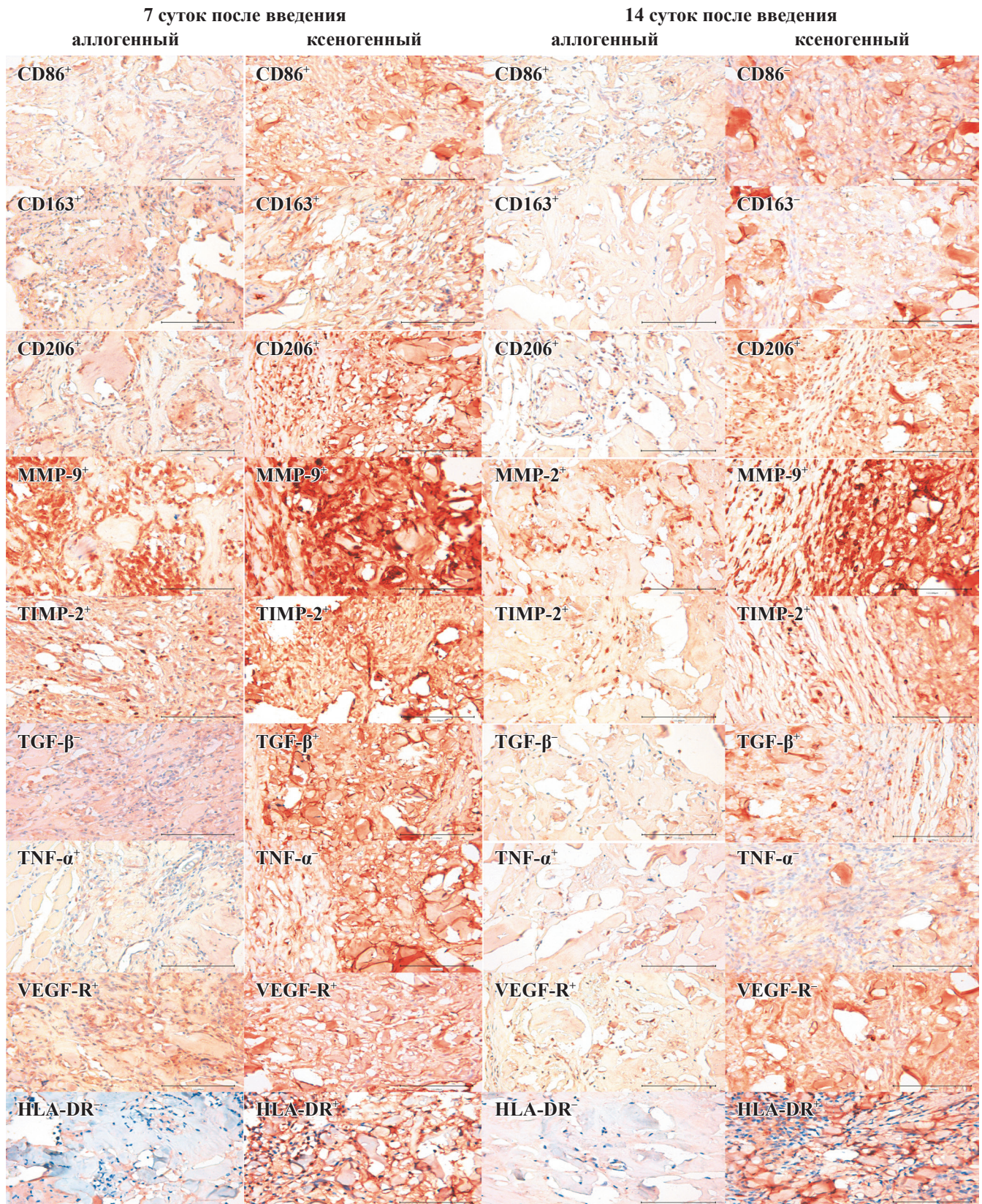


Рис. 5. Факторы роста и цитокины клеток после трансплантации ДАБ и ДКБ через 7 и 14 суток *in vivo*. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления антигенов с докраской гематоксилином на парафиновых срезах. «+» – позитивная реакция, «-» – негативная реакция

Fig. 5. Growth factors and cytokines in cells at 7 and 14 days after *in vivo* transplantation of DAB and DXB. Indirect immunoperoxidase staining for antigen detection with hematoxylin counterstaining in paraffin-embedded sections. Positive staining is indicated by «+», and absence of staining by «-»

После трансплантации аллогенного и ксеногенного внеклеточного матрикса гуманизированным мышам к месту имплантации мигрировали макрофаги M2-фенотипа и Т-хелперные клетки Th2-фенотипа. Однако аллотрансплантация вызывала меньшую инфильтрацию CD4<sup>+</sup> Т-хелперных клеток у гуманизированных мышей по сравнению с ксеногенным внеклеточным матриксом. В ответ на аллогенный гидрогелевый материал Т-хелперные клетки также были менее поляризованы в сторону проремоделирующего Th2-фенотипа по сравнению с ксеногенными гидрогелями внеклеточного матрикса [23].

Фенотип макрофагов, индуцированный внеклеточным матриксом, ассоциируется с повышением экспрессии противовоспалительных генов и белков, снижением или подавлением экспрессии провоспалительных генов и белков, высокой способностью к презентации антигенов CD206. Фенотип макрофагов в ответ на воздействие аллогенного внеклеточного матрикса отличается от фенотипа клеток, индуцированных ИФН $\gamma$  + ЛПС (классически активированные), ИЛ-4 (альтернативно активированные), ксеногенными и синтетическими матриксами [24]. Активация M2-подобных макрофагов биоматриксами на основе внеклеточного матрикса зависит от присутствия клеток Th2. Хотя точные механизмы, посредством которых внеклеточный матрикс способствует иммунному ответу типа 2, изучены лишь частично, известно, что для этого необходима деградация внеклеточного матрикса и последующее высвобождение скрытых пептидов, факторов роста и других биоактивных молекул [25].

Помимо этого, рельеф поверхности биоматериала, размерность частиц влияют на адгезию, морфологию клеток в результате их механочувствительности, которая заставляет клетки воспринимать внешние сигналы из окружения и изменять нижележащие сигнальные пути. Жесткие коллагеновые матрицы стимулируют экспрессию белков и генов IL10, IL12 и TNF $\alpha$ . Присутствие сульфатированных и несulfатированных ГАГ ингибирует этот эффект поляризации. Кроме того, контрольные эксперименты на 2D-матрицах подчеркивают важность использования 3D-матриц с контролируемой жесткостью, поскольку макрофаги демонстрируют обратное поляризационное поведение в зависимости от наличия ГАГ [26].

Методы обработки, используемые при изготовлении биоматериала, могут оказывать существенное влияние на профиль фенотипа макрофагов и последующие варианты ремоделирования [27]. Качество децеллюляризации ткани, возраст донора ткани и сшивание являются важнейшими параметрами, которые могут существенно повлиять на реакцию организма [28]. ДНК, митохондрии и остатки клеточных мембран в коллагеновых каркасах способствуют формированию провоспалительного фенотипа

макрофагов M1 *in vivo* и *in vitro* [29]. Внеклеточный матрикс, полученный от старых доноров, изменяет свой состав [30], связан с повышенной экспрессией провоспалительной iNOS, сниженной экспрессией МНС-II и продукцией оксида азота *in vitro*, стимулирует менее выраженный проремоделирующий ответ макрофагов и подвергается фиброзу по сравнению с внеклеточным матриксом от более молодых особей [31]. Гомологичный внеклеточный матрикс превосходит аналогичный и гетерологичный, сохраняет специфические благоприятные свойства нативной ткани, однако эти свойства минимально влияют на общий процесс ремоделирования [32].

Несмотря на децеллюляризацию и стандартную обработку биоматериалов различных видов и происхождения, установлено, что существует видоспецифичность, и она обусловлена антигенностью коллагена и связанных с ним протео- и гликопротеидов, имеющих высокий молекулярный вес, специфические микроРНК, многообразные конформации, молекулярное разнообразие [33]. ГАГ обладают молекулярным распознаванием и инструктивными свойствами клеток, действующими в развитии тканей, ремоделировании и восстановлении соединительной ткани [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Макрофаги в культуре и в ткани при использовании аллогенного диспергированного биоматериала ведут себя по-разному. Существуют различия секреторной активности при культивации макрофагов из моноцитов *in vitro* и макрофагов *in vivo*. Несмотря на стандартную обработку биоматериалов, децеллюляризацию, вид ткани – различное происхождение и видовая специфичность – определяет фенотип макрофагов, клеточную реакцию и исход заживления.

*In vitro* после пересадки моноцитов на подложку из губчатого аллогенного биоматериала клетки приобретали морфологию зрелых макрофагов с изменением формы, клеточной поверхности. Моноциты после культивирования на диспергированном аллобиоматериале экспрессировали CD68, CD206, VEGF-R. Реакция к антителам CD86, TGF- $\beta$ , CD163, FGF-1, MMP-9, TIMP-2 была негативной.

Мы впервые выявили особенности изменений состава макрофагов после алло- и ксенотрансплантации *in vivo*, показали взаимосвязь исходов заживления с фенотипическими особенностями M2-макрофагов. *In vivo* после введения аллогенного биоматериала формировался васкуляризированный регенерат, представленный рыхлой волокнистой соединительной тканью. Этому предшествовало высвобождение ГАГ из состава коллагеновых волокон биоматериала и секреция их макрофагами. Аллогенный биоматериал активно лизировался, резорбировался, замещался без признаков инкапсуляции. Выявлялись макрофаги

различных фенотипов: M1 (CD86) и M2 (CD206 и CD163). При этом были TGF- $\beta$ – негативны, VEGF-R и TNF- $\alpha$  позитивны. Они не проявляли антигенные свойства HLA-DR.

После подкожного введения ксеногенного биоматериала наблюдались признаки инкапсуляции биоматериала, развивалось гранулематозное воспаление, резорбция частиц биоматериала была затруднена, ГАГ не определялись. Макрофаги присутствовали с фенотипом M2 (CD206<sup>+</sup>), которые трансформировались в гигантские клетки инородных тел. Они были позитивны к TGF- $\beta$ , проявляли антигенные свойства HLA-DR и негативны к TNF- $\alpha$ .

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhao P, Yang F, Jia X, Xiao Y, Hua Ch, Xing M, Lyu G. Extracellular Matrices as Bioactive Materials for In Situ Tissue Regeneration. *Pharmaceutics*. 2023; 15 (12): 2771. doi: 10.3390/pharmaceutics15122771.
2. Rezvani GE, Nourbakhsh N, Akbari KM, Zare M, Ramakrishna S. Collagen-based biomaterials for biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021; 109 (12): 1986–1999. doi: 10.1002/jbm.b.34881.
3. Piatnitskaia S, Rafikova G, Bilyalov A, Chugunov S, Akhatov I, Pavlov V, Kzhyshkowska J. Modelling of macrophage responses to biomaterials *in vitro*: state-of-the-art and the need for the improvement. *Front Immunol*. 2024; 15: 1349461. doi: 10.3389/fimmu.2024.1349461.
4. Xia T, Zhang M, Lei W, Yang R, Fu Sh, Fan Z et al. Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization. *Front Immunol*. 2023; 14: 1160719. doi: 10.3389/fimmu.2023.1160719.
5. Wadhonkar K, Singh Y, Rughetti A, Das S, Yangdol R, Sk MH, Baig MS. Role of cancer cell-derived exosomal glycoproteins in macrophage polarization. *Mol Biol Rep*. 2025; 52 (1): 451. doi: 10.1007/s11033-025-10535-x.
6. Douthwaite H, Arteagabeitia AB, Mukhopadhyay S. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cell into Macrophages. *Bio Protocol*. 2022; 12 (6): e4361. doi: 10.21769/BioProtoc.4361.
7. Yang Y, Liu H, Guo K, Yu Q, Zhao Y, Wang J et al. Extracellular Vesicles from Compression-Loaded Cementoblasts Promote the Tissue Repair Function of Macrophages. *Adv Sci (Weinh)*. 2024; 11 (36): e2402529. doi: 10.1002/advs.202402529.
8. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2020; 116 (6): 1101–1112. doi: 10.1093/cvr/cvz336.
9. Cheng P, Li S, Chen H. Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. *Cells*. 2021; 10 (2): 436. doi: 10.3390/cells10020436.
10. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition.
11. Волкова ОВ, Шахламов ВА, Миронов АА. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей, органов. М.: Медицина, 1987. *Volkova OV, Shakhlov VA, Mironov AA. Atlas of scanning electron microscopy of cells, tissues, and organs. Moscow: Meditsina, 1987. [In Russ, English abstract].*
12. Maloney SE, Broberg CA, Grayton QE, Samantha LP, Hall HR, Wallet ShM et al. Role of Nitric Oxide-Releasing Glycosaminoglycans in Wound Healing. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022; 8 (6): 2537–2552. doi: 10.1021/acsbomaterials.2c00392.
13. Лебедева АИ. Регуляция паренхиматозно-стромальных взаимоотношений при коррекции дефектов скелетной мышцы аллогенным биоматериалом. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. 2014; 1: 51–56. *Lebedeva AI. Regulation of parenchymatous-stromal relationships during correction of skeletal muscle defects with allogeneic biomaterial. Experimental and Clinical Dermatocosmetology*. 2014; 1: 51–56. [In Russ, English abstract].
14. Ricard-Blum S, Perez S. Glycosaminoglycan interaction networks and databases. *Curr Opin Struct Biol*. 2022; 74: 102355. doi: 10.1016/j.sbi.2022.102355.
15. Taieb M, Ghannoum D, Barré L, Ouzzine M. Xylosyltransferase I mediates the synthesis of proteoglycans with long glycosaminoglycan chains and controls chondrocyte hypertrophy and collagen fibers organization of in the growth plate. *Cell Death Dis*. 2023; 14 (6): 355. doi: 10.1038/s41419-023-05875-0.
16. Kawakami N, Nägerl UV, Odoardi F, Bonhoeffer T, Wekerle H, Flügel A. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med*. 2005; 201 (11): 1805–1814. doi: 10.1084/jem.20050011.
17. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013; 496 (7446): 445–455. doi: 10.1038/nature12034.
18. Fang JY, Yang Z, Hu W, Hoang BX, Han B. Viscoelastic BH Hydrogel Modulates Phenotype of Macrophage-Derived Multinucleated Cells and Macrophage Differentiation in Foreign Body Reactions. *J Biomed Mater Res A*. 2025; 113 (1): e37814. doi: 10.1002/jbm.a.37814.
19. Tanneberger AM, Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C, Orłowska A, Kubesch A, Sader R et al. Multinucleated giant cells within the *in vivo* implantation bed of a collagen-based biomaterial determine its degradation pattern. *Clin Oral Investig*. 2021; 25 (3): 859–873. doi: 10.1007/s00784-020-03373-7.
20. Lössllein AK, Lohrmann F, Scheuermann L, Gharun K, Neuber J, Kolter J et al. Monocyte progenitors give rise to multinucleated giant cells. *Nat Commun*. 2021; 12 (1): 2027. doi: 10.1038/s41467-021-22103-5.
21. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16 (6): 358–372. doi: 10.1038/nrn3880.
22. Wang RM, Johnson TD, He J, Rong Z, Wong M, Nigam V et al. Humanized mouse model for assessing the human immune response to xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials. *Biomaterials*. 2017; 129: 98–110. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.016.

23. Xu M, Su T, Jin X, Li Y, Yao Y, Liu K et al. Inflammation-mediated matrix remodeling of extracellular matrix-mimicking biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2022; 151: 106–117. doi: 10.1016/j.actbio.2022.08.015.
24. Sadtler K, Wolf MT, Ganguly S, Moad CA, Chung L, Majumdar S et al. Divergent immune responses to synthetic and biological scaffolds. *Biomaterials.* 2019; 192: 405–415. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.11.002.
25. Wolf MT, Ganguly S, Wang TL, Anderson CW, Sadtler K, Narain R et al. A biologic scaffold-associated type 2 immune microenvironment inhibits tumor formation and synergizes with checkpoint immunotherapy. *Sci Transl Med.* 2019; 11 (477): eaat7973. doi: 10.1126/scitranslmed.aat7973.
26. Friedemann M, Kalbitzer L, Franz S, Moeller S, Schnabelrauch M, Simon JC et al. Instructing Human Macrophage Polarization by Stiffness and Glycosaminoglycan Functionalization in 3D Collagen Networks. *Adv Healthc Mater.* 2017; 6 (7): 1600967. doi: 10.1002/adhm.201600967.
27. Badylak SF. Decellularized Allogeneic and Xenogeneic Tissue as a Bioscaffold for Regenerative Medicine: Factors that Influence the Host Response. *Ann Biomed Eng.* 2014; 42 (7): 1517–1527. doi: 10.1007/s10439-013-0963-7.
28. Londono R, Dziki JL, Haljasmaa E, Turner NJ, Leifer CA, Badylak SF. The effect of cell debris within biologic scaffolds upon the macrophage response. *J Biomed Mater Res A.* 2017; 105 (8): 2109–2118. doi: 10.1002/jbm.a.36055.
29. Tottey S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, Zhang L, Jiang H et al. The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials.* 2011; 32 (1): 128–136. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.006.
30. deSouza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology.* 2002; 3 (6): 325–335. doi: 10.1023/a:1021312027486.
31. Keane TJ, DeWard A, Londono R, Saldin LT, Castleton AA, Carey L et al. Tissue-specific effects of esophageal extracellular matrix. *Tissue Eng Part A.* 2015; 21 (17–18): 2293–2300. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0322.
32. Hayes AJ, Melrose J. HS, An Ancient Molecular Recognition and Information Storage Glycosaminoglycan, Equips HS-Proteoglycans with Diverse Matrix and Cell-Interactive Properties Operative in Tissue Development and Tissue Function in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (2): 1148. doi: 10.3390/ijms24021148.
33. Huleihel L, Bartolacci JG, Dziki JL, Vorobyov T, Arnold B, Scarritt ME et al. Matrix-Bound Nanovesicles Recapitulate Extracellular Matrix Effects on Macrophage Phenotype. *Tissue Eng Part A.* 2017; 23 (21–22): 1283–1294. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0102.
34. Ghatak S, Maytin EV, Mack JA, Hascall VC, Atanelishvili I, Rodriguez RM et al. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *Int J Cell Biol.* 2015; 2015: 834893. doi: 10.1155/2015/834893.

*Статья поступила в редакцию 9.10.2025 г.  
The article was submitted to the journal on 9.10.2025*