© Коллектив авторов, 2020

Милешина С.Е.^{1,2}, Николин А.А.^{1,2}, Козлов И.Г.^{1,3,4}

Влияние коллагеновых матрикинов на функциональное состояние лейкоцитов человека

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 236041, г. Калининград, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127994, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Матрикины – биологически активные соединения, образующиеся при частичном протеолизе белков и гликозаминогликанов внеклеточного матрикса, действуют как эндогенные регуляторы многих физиологических и патологических процессов организма. Полученные из коллагеновых белков матрикины (КМ) усиливают пролиферацию клеток соединительной ткани, стимулируют их адгезию, миграцию и синтез различных компонентов экстраклеточного матрикса, цитокинов и ростовых факторов. КМ регулируют тонус и проницаемость сосудов, участвуют в белок-белковых взаимодействиях, изменяющих функции других молекул, способствуют регенерации нервной ткани. Однако воздействие КМ в отношении клеток иммунной системы изучено далеко не полностью.

Цель исследования – комплексная оценка действия низкомолекулярных КМ на функциональную активность лейкоцитов периферической крови человека.

Материал и методы. Фракцию низкомолекулярных КМ (мол. масса <10 кДа) получали гидролизом коллагенового матрикса бактериальной коллагеназой. В зависимости от метода исследования изучение действия КМ проводили либо в цельной гепаринизированной венозной крови, либо во фракции нейтрофилов, выделенных из крови здоровых доноров. Оценивали влияние КМ на поглотительную и переваривающую функции лейкоцитов, а также на продукцию ими активных форм кислорода.

Результаты. Получены данные, что КМ способны изменять эффекторные функции фагоцитов: хотя пептиды и не повышают поглотительную способность клеток, они стимулируют их бактерицидную и синтетическую активность. Эффективность КМ зависит от их концентрации: максимальный эффект наблюдался при низких и средних концентрациях КМ (10–100 мкг/мл) и нивелировался при максимальной концентрации КМ (1000 мкг/мл).

Заключение. Таким образом, КМ проявляют иммунорегуляторную активность в отношении клеток врожденного иммунитета.

Ключевые слова: коллагеновые матрикины; лейкоциты; фагоциты; синтез активных форм кислорода; бактерицидные функции; поглотительная способность

Статья получена 13.05.2020. Принята к печати 16.06.2020.

Для цитирования: Милешина С.Е., Николин А.А., Козлов И.Г. Влияние коллагеновых матрикинов на функциональное состояние лейкоцитов человека. Иммунология. 2020; 41 (4): 295–303. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-295-303>

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Козлов Иван Генрихович –
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией
экспериментальной
и клинической фармакологии
ФГБУ НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: immunopharmacology@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>

Mileshina S.E.^{1,2}, Nikolin A.A.^{1,2}, Kozlov I.G.^{1,3,4}

Effect of collagen matrikines on the functional state of human leukocytes

¹ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

² Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

³ Immanuel Kant Baltic Federal University, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 236041, Kaliningrad, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, 127994, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Matrikines – biologically active compounds formed during partial proteolysis of proteins and glycosaminoglycans of the extracellular matrix, act as endogenous regulators of many physiological and pathological processes of the body. Matrikines obtained from collagen proteins (CM) enhance the proliferation of connective tissue cells, stimulate their adhesion, migration and synthesis of various components of the extracellular matrix, cytokines and growth factors. CM regulate vascular tone and permeability, participate in protein-protein interactions that change the functions of other molecules, and contribute to the regeneration of nervous tissue. However, the effects of CM on immune system cells have not been fully studied.

The aim of this study was a comprehensive assessment of the effect of low-molecular weight CM on the functional activity of human peripheral blood leukocytes.

Material and methods. The fraction of low-molecular weight CM ($M_w < 10$ kDa) was obtained by hydrolysis of the collagen matrix with bacterial collagenase. Depending on the method of investigation, the study of the effect of CM was performed either in whole heparinized venous blood, or in the fraction of neutrophils isolated from the blood of healthy donors. The effect of CM on the absorption and digesting functions of white blood cells, as well as their production of reactive oxygen species, was been evaluated.

Results. There has been evidence that CM are able to change the effector functions of phagocytes: although peptides do not increase the absorption capacity of phagocytes, they stimulate their bactericidal and synthetic activity. The effectiveness of CM depends on their concentration: the maximum effect was observed at low and medium concentrations of CM (10–100 mcg/ml) and was leveled at the maximum concentration of CM (1000 mcg/ml).

Conclusion. Thus, CM exhibit immunoregulatory activity against innate immune cells.

Keywords: collagen matrikines; leukocytes; phagocytes; synthesis of reactive oxygen species; bactericidal functions; absorption capacity

Received 13.05.2020. Accepted 16.06.2020.

For citation: Mileshina S.E., Nikolin A.A., Kozlov I.G. Effect of collagen matrikines on the functional state of human leukocytes. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 295–303. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-295-303> (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Ivan G. Kozlov –
Head of the Laboratory
of Experimental and Clinical
Pharmacology,
Dmitry Rogachev National
Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology,
Ministry of Health
of the Russian Federation,
Moscow, Russian Federation

E-mail: immunopharmacology@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>

Введение

Наряду с гормонами, цитокинами и нейропептидами в организме существует еще один тип регуляторных молекул – матрикины, которые образуются при деградации структурных компонентов экстраклеточного матрикса. По своей природе это низкомолекулярные пептиды или гликопептиды, способные оказывать влияние на функции клеток практически всех гистотипов. Матрикины воздействуют на клетки даже в очень низких концентрациях; в силу своего малого размера обладают высоким потенциалом распределения по тканям; проявляют устойчивость к действию тканевых протеаз.

Образование матрикинов происходит при естественном обновлении экстраклеточного матрикса [1]. При повреждении ткани их концентрация существенно нарастает [2, 3]. Действие матрикинов на клетки высокоспецифично, опосредуется через связывание с опреде-

ленными рецепторами, наиболее известные из которых относятся к семейству интегринов [4]. Они способны регулировать миграцию [1, 2], пролиферацию, апоптоз клеток, синтез компонентов экстраклеточного матрикса [4, 5], а также других регуляторных молекул и протеаз. За счет этого матрикины принимают участие в нормальных и патологических процессах [1, 3, 5, 6].

Основными структурными компонентами экстраклеточного матрикса являются коллагеновые белки, и именно они – наиболее вероятный источник образования регуляторных пептидов. Во многих исследованиях были получены доказательства участия коллагеновых матрикинов (КМ) как в нормальных физиологических процессах, так в патологических реакциях организма, таких как патологическое заживление ран, фиброз, воспаление и опухолевая инвазия. Для многих КМ установлены химическая структура, биологичес-

кие функции, определены рецепторы и сигнальные пути [7], через которые они участвуют в регуляции клеточной активности. Так, например, хорошо изучен и успешно применяется в медицине полученный из коллагена I типа медь-содержащий трипептид (GHK-Cu²⁺). Он участвует в регуляции ремоделирования дермы на поврежденном участке: стимулирует синтез коллагена и гликозаминогликанов фибробластами, усиливает пролиферацию базальных эпителиальных клеток, экспрессию интегринов кератиноцитами [8], активирует пролиферацию фибробластов [9, 10], индуцирует последовательно синтез MMP-2 и MMP-9 [11]. Этот матрикин используется в дерматологии и косметологии аппликационно в месте повреждения кожи, ускоряя ее заживление и препятствуя формированию келоидного рубца. Также были получены данные, что GHK-Cu²⁺ является хемоаттрактантом для моноцитов/макрофагов и тучных клеток [11], поддерживает регенерацию нервной ткани [14], стимулирует ангиогенез [11], митотическую активность гепатоцитов [13] и нейронов [12, 14]. Другой коллагеновый пентапептид KTTKS, представляющий собой фрагмент проколлагена I, стимулирует выработку коллагенов I, III и VI типов, фибронектина, эластина и гликозаминогликана [15, 16]. GHK и KTTKS широко применяются в дерматологии для замедления проявлений возрастных изменений кожи [17].

Трипептид RGD (Arg-Gly-Asp), образующийся при протеолизе матричных белков (коллагенов, ламининов, фибронектина), белков плазмы крови (витронектина и фибриногена) и белков, синтезируемых в месте повреждения тканей (остеопонтина и тенасцина) [18], также обладает значительным регуляторным потенциалом. Матрикины, содержащие в составе последовательность RGD, усиливают адгезию клеток к матриксу (фибробласты, кератиноциты, хондроциты, эпителиоциты, тромбоциты, эндотелиоциты, клетки островков Лангерганса и др.) [18, 19], активируют клеточную пролиферацию и дифференцировку (мегакариоциты, эндотелиоциты), регулируют тонус сосудов [19, 20], ингибируют синтез провоспалительных цитокинов фагоцитирующими клетками [18, 21], активируют нейтрофилы [21]. Лекарственный препарат, содержащий RGD-мотив (эпителифатит) активно используют в качестве антиагрегантного средства при остром коронарном синдроме и при проведении чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики из-за его способности быстро и эффективно блокировать GpIIb/IIIa-рецепторы тромбоцитов [22]. В настоящее время разрабатываются различные подходы в терапии онкологических заболеваний, где RGD-мотив используется в качестве посредника, прицельно доставляющего цитостатики и другие антибластомные средства в опухолевую ткань [23, 24]. Кроме того, RGD-пептиды используют для создания интегрин-таргетных диагностических молекулярных зондов для визуализации первичных опухолей и метастазов [25].

Пептиды GPR из коллагенов I–III типов и KPGEPK из коллагена III типа, вступая во взаимодействие с фиб-

рином, ингибируют его полимеризацию [26], в то время как матрикины PGP, PG и WP блокируют формирование тромбинового комплекса [27].

Отдельные КМ оказывают значительные эффекты и на лейкоцитарное звено. Матрикины PGP [3, 6, 28], (PPG)₅ и (PHypG)₅ [29] являются хемоаттрактантами для нейтрофилов. PGP усиливает выработку нейтрофилами супероксида, МР-9 и ИЛ-8, высвобождение провоспалительного медиатора эндотелина-1 из эндотелиальных клеток [6, 30]. Пептиды (PPG)₅ и (PHypG)₅ способны активировать в нейтрофилах синтез свободных радикалов и блокировать их апоптоз, а также они обладают активностью в отношении моноцитов/макрофагов: индуцируют их хемотаксис и продукцию свободных радикалов, протеолитических ферментов и синтез нейтрофильных хемоаттрактантов [21, 29, 31].

Целью настоящего исследования было комплексное изучение влияния низкомолекулярных КМ на функционирование лейкоцитов периферической крови человека.

Материал и методы

Методы исследования выбирали в соответствии с рекомендациями, приведенными в руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [32].

Получение препарата низкомолекулярных КМ. В работе изучали эффекты фракции низкомолекулярных пептидов, полученных ферментативной деградацией коллагена I типа. Источником коллагена I типа служили хвостовые сухожилия лабораторных беспородных крыс. Сухожилия экстрагировали в 100-кратном объеме 0,3 % уксусной кислоты, центрифугировали для удаления оставшихся фрагментов, собранную надосадочную жидкость нейтрализовали гидроксидом натрия до pH 7,2 и диализовали против двух смен 1,2 М хлорида натрия. Коллаген высаливали в градиенте хлорида натрия (2,0–2,5 М), осадок собирали центрифугированием, отмывали дистиллированной водой и перерастворяли в 0,3 % растворе уксусной кислоты. Раствор коллагена стерилизовали центрифугированием (20 часов, 1700 об/мин). Концентрацию коллагена в растворе определяли спектрофотометрически с помощью специфического окрашивания оксипролина реактивом Эрлиха [33].

Для получения препарата КМ из раствора коллагена формировали матрикс путем повышения ионной силы и pH раствора. Матрикс механически разрушали, коллагеновые фибриллы собирали центрифугированием, двукратно отмывали раствором Хенкса и проводили гидролиз осадка (24 часа, 37 °C) очищенной бактериальной коллагеназой (кlostридиопептидаза А, соотношение фермент : субстрат – 1:20). Гидролизат центрифугировали, отбирали супернатант и помещали в пробирки для ультрафильтрации (Millipore, диаметр пор 10 кДа). Центрифугировали (25 мин, 4000 об/мин), отбирали фракцию с молекулярной массой ниже 10 кДа и стерилизовали фильтрованием через фильтры с диаметром пор

0,2 мкм. Концентрацию КМ определяли спектрофотометрически по оксипролину [33]. Препарат ампулировали и хранили при температуре -20°C.

Выделение нейтрофилов периферической крови человека. Образцы крови для исследования были получены из отделения трансфузиологии НМИЦ «ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России после предварительного тестирования в соответствии с протоколом заготовки препаратов донорской крови. Нейтрофилы выделяли из крови в стерильных условиях стандартным методом, используя двойной градиент плотности [34]. Для этого венозную гепаринизированную кровь, разведенную 1:2 раствором Хенкса, наслаивали на градиент плотности: нижний слой – плотность 1,119 г/см³, верхний – плотность 1,077 г/см³ и центрифугировали в горизонтальном роторе 30 мин, 400g. Полученную на границе фаз фракцию нейтрофилов дважды отмывали центрифугированием в растворе Хенкса (10 мин, 200g), а затем переносили в среду RPMI 1640. Количество выделенных нейтрофилов подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике.

Исследование поглотительной активности лейкоцитов. Количественную оценку поглотительной активности фагоцитов крови проводили методом проточной лазерной цитометрии, используя в качестве агента для фагоцитоза стафилококк, меченный флуоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ) [35, 36]. На первом этапе производили мечение бактерий ФИТЦ: суточную культуру *Staphylococcus aureus*, штамм Cowan I (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Россия) стерилизовали, осаждали центрифугированием 25 мин, 1000g, отмывали 0,1 М карбонатно-бикарбонатным буфером pH 9,5, и концентрацию бактерий доводили по стандарту мутности до $2 \cdot 10^8$ /мл, а затем инкубировали с ФИТЦ (50 мкг на $1 \cdot 10^8$ бактерий). Не связавшуюся с микроорганизмами флуоресцентную метку отмывали центрифугированием в фосфатно-солевом буфере (1000g, 10 мин). ФИТЦ-*S. aureus* аликвотировали и хранили при -50 °C.

Реакцию поглощения лейкоцитами ФИТЦ-*S. aureus* ставили в цельной гепаринизированной крови: к меченному стафилококку ($2 \cdot 10^8$ /мл), добавляли кровь и КМ в концентрациях 1–1000 мкг/мл (в контрольные образцы добавляли раствор Хенкса). После инкубации (30 мин, 37°C и 5 % CO₂) проводили лизис эритроцитов в течение 10 мин., далее дважды центрифугировали клетки (250g, 5 мин) в отмывочном растворе, а затем фиксировали осадок в фиксирующем растворе (все растворы были получены от BD Biosciences, Бельгия). Сбор клеток и обработку полученных результатов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Becton Coulter, США) с программным обеспечением CXP. Настройки цитометра: на диаграмме прямого и бокового светорассеивания размещались три облака: нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. Соответственно облакам нейтрофилов и моноцитов выводились гистограммы флуоресценции, настроенные на ФИТЦ. Усиление устанавливалось таким образом, чтобы пики нефлуоресцирующих (M₁) и флуоресцирующих (M₂) фагоцитов находились по

разные стороны от 100-канала. При оценке действия КМ на поглотительную активность фагоцитов сравнивали в опытных и контрольных (без добавления КМ) образцах количество флуоресцирующих клеток к общему числу нейтрофилов или моноцитов.

Исследование эффективности фагоцитоза. Оценку поглотительной и переваривающей способности фагоцитов проводили в цельной венозной крови, используя модификацию классического микробиологического метода [33]. Реакцию поглощения проводили так же, как было описано выше, используя в качестве агента для фагоцитоза живую суточную культуру *Staphylococcus aureus*, штамм Cowan I. Время инкубации клеток со стафилококком составляло 30 и 60 мин. КМ добавляли в пробы в концентрациях 1–1000 мкг/мл, а в контроль – эквивалентные объемы раствора Хенкса. По истечении времени культивирования пробы центрифугировали (10 мин, 200g, 4°C), собирали осадок и готовили мазки на обезжиренных предметных стеклах. Препараты высушивали при комнатной температуре, фиксировали 10 мин в смеси Никифорова и затем окрашивали в течение 30 мин по методу Романовского-Гимза. Результаты учитывали микроскопически при увеличении 90×10, подсчитывая такие параметры, как фагоцитарный индекс (ФИ, количество фагоцитировавших клеток из 100 подсчитанных нейтрофилов) и фагоцитарное число (ФЧ, среднее число микроорганизмов, поглощенных одним нейтрофилом). Для оценки бактерицидной функции фагоцитов определяли показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) по формуле:

$$ПЗФ = \frac{\text{общее количество переваренных микроорганизмов}}{\text{общее количество поглощенных микроорганизмов}}.$$

При оценке действия пептидов сравнивали данные показатели в пробах, обработанных КМ, и в контроле.

Исследование продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами и моноцитами. В работе использовали стандартный метод хемилюминесценции (ХЛ) с 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазидином (люминол). В качестве индуктора ХЛ использовали зимозан А, предварительно опсонизированный сывороткой крови человека (25 мг зимозана, 1,25 мл раствора Хенкса и 1,25 мл сыворотки, 37 °C, 30 мин). После опсонизации зимозан трижды отмывали раствором Хенкса центрифугированием (10 мин, 300g).

Цельную гепаринизированную кровь инкубировали (60 мин, 37 °C, 5 % CO₂) в присутствии КМ в концентрациях от 1 до 1000 мкг/мл (контроль – раствор Хенкса). Для измерения ХЛ использовали хемилюминометр CLM-3 (AD Instruments, Австралия), оценивая сначала уровень спонтанного свечения клеток, а затем уровень активированной ХЛ (добавляли зимозан А до 0,56 мг/мл), которую фиксировали в течение 5–8 мин. Кинетику ответа клеток регистрировали и обрабатывали с помощью рабочей станции MacLab (AD Instruments, Австралия: Macintosh LC 475+MacLab/2E+Chart V 3.4.1). При ана-

лизе кривых ХЛ использовали два основных параметра: максимум интенсивности спонтанной ХЛ и амплитуда интенсивности, активированной зимозаном ХЛ (max активированной ХЛ – среднее спонтанной ХЛ).

Для оценки действия КМ на продукцию клетками АФК сравнивали максимумы интенсивности спонтанной ХЛ и амплитуды интенсивности, активированной ХЛ в контроле и при обработке КМ. Результат выражали в процентах от контроля.

Статистическая обработка результатов. Характер вариабельности результатов экспериментов подчинялся законам нормального распределения. Статистическую обработку результатов экспериментальных данных проводили с помощью пакета анализа данных программного обеспечения «Microsoft Excel» путем расчета средней арифметической (M) и средней ошибки средней арифметической (m). Для оценки достоверности выявленных различий средних арифметических в группах использовали t -критерий Стьюдента, разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Результаты

Оценку регуляторного потенциала КМ в отношении лейкоцитов человека начали с изучения их влияния на поглощательную способность клеток. В предварительных экспериментах было установлено, что период полного поглощения ФИТЦ-*S. aureus* интактными лейкоцитами составляет 30 мин, и это время было выбрано для данного этапа работы. К сожалению, такие условия эксперимента не позволили выявить отличия в ФЧ нейтрофилов и макрофагов в присутствии всех исследуемых концентраций КМ по сравнению с контролем ($80,0 \pm 4,0$ % vs. $74,3 \pm 3,6$ %, соответственно). В связи с этим время инкубации лейкоцитов с ФИТЦ-*S. aureus* было увеличено до 3 ч. Однако это не привело ни к увеличению ФЧ в контроле, ни к различиям в опытных и контрольных образцах по этому показателю. Таким образом, единственный вывод из этого этапа исследований заключается в том, что КМ не блокируют фагоцитоз микроорганизмов макрофагами и нейтрофилами периферической крови человека.

На следующем этапе работы было решено исследовать действие КМ на эффективность фагоцитоза, используя хорошо зарекомендовавший себя в клинической практике рутинный метод иммерсионной микроскопии мазков цельной крови, окрашенных по методу Романовского-Гимза, после предварительной инкубации клеток с различными концентрациями КМ (опыт) или в их отсутствии (контроль). Оценивали ФИ, ФЧ и ПЗФ.

Были получены данные, подтверждающие результаты проточной лазерной цитометрии: добавление КМ в образцы, независимо от их концентрации, не приводило к изменению числа фагоцитирующих клеток по сравнению с контролем. Так, после 30-минутной инкубации с бактериями, ФИ в среднем составлял $83,6 \pm 3,4$ %, а после 60-минутной инкубации – $88,2 \pm 5,3$ %.

Однако при исследовании качественных характеристик фагоцитоза были получены интересные данные: КМ существенно повышали эффективность фагоцитоза

лейкоцитов, и при этом прослеживался четкий дозозависимый эффект. В 30-минутных образцах, содержащих 1 мкг/мл КМ, ФЧ было сравнимо с контрольным значением. В средних концентрациях (10–100 мкг/мл) КМ значительно усиливали фагоцитарную активность клеток, причем доза КМ в 100 мкг/мл давала наиболее выраженный эффект: ФЧ составляло $160,8 \pm 8,6$ % от контроля ($p < 0,05$) (рис. 1). При использовании максимальной дозы КМ (1000 мкг/мл) наблюдалось ингибирование фагоцитарной активности клеток.

Те же изменения наблюдались и при 60-минутной инкубации. Уже при добавлении КМ в концентрации 1 мкг/мл наблюдалось усиление бактерицидной активности нейтрофилов и моноцитов: ПЗФ при этой дозе КМ составлял $40,6 \pm 0,8$ % ($p < 0,05$), превышая, таким образом, показатели в контрольных образцах почти в 2 раза (рис. 2). Увеличение концентрации пептидов приводило к еще большему увеличению показателя ПЗФ и достигало максимума при дозе КМ в 100 мкг/мл ($74,8 \pm 1,8$ %, $p < 0,05$). В дозе 1000 мкг/мл КМ ингибировали бактерицидную функцию фагоцитов (рис. 2).

При иммерсионной микроскопии мазков хорошо видно, что воздействие КМ усиливает бактерицидную активность лейкоцитов. В присутствии КМ в низких и средних концентрациях (1–100 мкг/мл) по сравнению с контрольными образцами в клетках наблюдается больше разрушенных бактерий, которые имеют маленькие размеры и окрашены в розовый цвет (см. рис. 2). При добавлении КМ в максимальной концентрации микроскопическая картина аналогична таковой в контрольных образцах: преобладают целые бактерии фиолетового цвета.

Механизмом усиления бактерицидной функции фагоцитов может быть активация синтеза в клетках актив-

Рис. 1. Зависимость поглощательной активности лейкоцитов периферической крови человека от присутствия коллагеновых матрикинов

Реакция поглощения лейкоцитами *S. aureus* в цельной гепаринизированной крови здоровых доноров (30 мин, 37 °C и 5 % CO_2) в присутствии различных концентраций КМ (1–1000 мкг/мл) по сравнению с контролем (эквивалентные объемы раствора Хенкса). В иммерсионной системе подсчитывали фагоцитарное число (в контроле принято за 100%). Звездочки указывают на достоверные различия ($p < 0,05$, t -критерий Стьюдента).

Рис. 2. Влияние коллагеновых матрикинов на завершенность фагоцитоза лейкоцитов периферической крови человека

Реакция поглощения лейкоцитами живого *S. aureus* (суточная культура) в цельной гепаринизированной крови здоровых доноров (60 мин, 37 °C и 5 % CO₂) в присутствии разных концентраций КМ 1–1000 мкг/мл по сравнению с контролем (эквивалентные объемы раствора Хенкса).

1. Показатель завершенности фагоцитоза при иммерсионной микроскопии мазков (увеличение 90×10, окраска по Граму). Звездочки указывают на достоверные различия ($p < 0,05$, t -критерий Стьюдента).

2. Иммерсионная микроскопия мазков периферической крови человека после 60 мин инкубации (увеличение 90×10, окраска по Граму): А – без КМ; Б – в присутствии КМ (100 мкг/мл).

Рис. 3. Изменение интенсивности активированной хемилюминесценции под действием коллагеновых матрикинов

Сравнение хемилюминесценции лейкоцитов цельной гепаринизированной крови (здоровые доноры), преинкубированных (1 ч, 37 °C, 5 % CO₂) с различными концентрациями КМ и активированных зимозаном А, с контролем (раствор Хенкса). Показатель хемилюминесценции в контроле принят за 100 %. Звездочки указывают на достоверные различия ($p < 0,05$, t -критерий Стьюдента).

По оси абсцисс: концентрации коллагеновых матрикинов (мкг/мл): 1 – 1 мкг/мл; 2 – 10 мкг/мл; 3 – 100 мкг/мл; 4 – 1000 мкг/мл.

По оси ординат: интенсивность хемилюминесценции.

ных форм кислорода. Для проверки этого предположения мы провели ряд опытов, направленных на изучение влияния КМ на уровень продукции свободных радикалов в лейкоцитах периферической крови человека. В исследовании использовали метод люминол-зависимой хемилюминесценции: сравнивали уровень спонтанной и активированной зимозаном А ХЛ в образцах, преинкубированных с различными концентрациями КМ (1–1000 мкг/мл), с контролем (раствор Хенкса). Результаты выражали в процентах.

Уровень спонтанной ХЛ в контрольных образцах достигал плато через 4–5 мин и составлял в среднем $3,0 \pm 1,4$ мВ. Ни одна из добавленных доз КМ не приводила к изменению интенсивности спонтанной ХЛ по сравнению с контролем ($p > 0,05$).

При измерении зимозан-индуцированной ХЛ эффект зависел от дозы добавленных пептидов: в дозе 1 мкг/мл КМ амплитуда ХЛ не отличалась от контрольных значений (в среднем 310 мВ, $p > 0,05$), в дозе 10 и 100 мкг/мл КМ выражено увеличивали амплитуду ХЛ ($135,7 \pm 7,1$ и $124,0 \pm 6,0$ % от уровня контроля, соответственно, $p < 0,05$), а в дозе КМ 1000 мкг/мл опять наблюдалось снижение показателей ХЛ, сравнимое с контрольными значениями (рис. 3).

Обсуждение

Коллагеновые белки I типа – одни из самых распространенных в организме – они выявляются практически во всех тканях в качестве основы экстраклеточного матрикса. В некоторых тканях их количество достигает 100 мг на 1 г ткани. Коллагены I типа очень стабильны и имеют период «жизни» более 100 суток. Катаболизм этих белков в физиологических условиях осуществляется внутриклеточно, где они расщепляются до отдельных аминокислот, причем большинство из них реутилизуются в реакциях синтеза белка, а две маркерные аминокислоты (оксипролин и оксилизин) выводятся из организма с мочой [28].

В условиях воспалительной патологии (инфекции, травмы и др.) в силу быстрой тканевой деструкции разрушение коллагенов I типа идет в основном экстраклеточно с привлечением свободных радикалов, а также целого ряда протеиназ как самого хозяина, так и микроорганизмов. Этот протеолиз происходит не полностью и сопровождается накоплением фрагментов коллагена в очаге патологического процесса с их последующим попаданием в системный кровоток [2, 28].

Учитывая широкий функциональный потенциал коллагена как основного белка экстраклеточного матрикса, естественно было предположить, что его фрагменты также могут обладать разнообразной активностью в отношении клеток многих гистотипов. Это предположение сегодня имеет достаточное экспериментальное подтверждение, а физиологически активные пептиды получили название «матрикины» [1, 5].

В данной работе было изучено влияние КМ на параметры фагоцитоза нейтрофилов и макрофагов периферической крови человека, т.е. на клетки врожденного

иммунитета, находящиеся на первой линии иммуновоспалительной реакции и осуществляющие основные эффекторные функции. В качестве КМ использовали смесь пептидов коллагена I типа, полученную избыточным протеолизом этого белка высокоочищенной клостридиопептидазой А. Известно, что этот фермент расщепляет коллаген до коротких пептидов из 3–8 аминокислот, которые вполне могут сохранять биологическую активность. КМ исследовали в конечных дозировках от 1 до 1000 мг/мл.

Даже в самой высокой дозе КМ не снижали количество фагоцитирующих клеток обеих популяций. Увеличение данного показателя во всем исследованном диапазоне концентраций КМ также выявить не удалось. Однако ответ на вопрос о возможной стимуляции фагоцитоза лейкоцитов под влиянием КМ остается открытым, так как сама модель скорее рассчитана на выявление нарушений фагоцитоза со знаком минус, а не на его стимуляцию (85–95 % фагоцитирующих клеток в нестимулированном контроле).

В отличие от количественного показателя фагоцита, качественные параметры этого процесса под действием КМ менялись и зависели от дозы. Так, при средних концентрациях КМ (10–100 мкг/мл) существенно увеличивались поглотительная и переваривающая активность клеток, а также продукция свободных радикалов. При высоких дозах КМ (1000 мкг/мл), напротив, наблюдалось ингибирование всех трех показателей.

С учетом современных представлений о динамике иммуновоспалительного процесса, полученные данные позволяют предположить, что повреждение тканей (инфекции, травма) приводят к локальному нарастанию концентрации КМ, которые при достижении определенного уровня активируют эффекторный потенциал фагоцитов. Это в свою очередь способствует усилению

очистки очага повреждения от микроорганизмов и продуктов деградации тканей, что создает предпосылки для начала процессов регенерации. Ингибирование эффекторного потенциала фагоцитов при высоких концентрациях КМ может быть объяснено необходимостью ограничения деструктивных процессов (по аналогии с механизмом отрицательной обратной связи).

Таким образом, результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что КМ проявляют свойства иммунорегуляторных веществ, способных усиливать активность клеток первичного звена противоинфекционной защиты исходя из их первоначального функционального состояния.

Выводы

1. Во всех исследованных концентрациях КМ (10–1000 мкг/мл) не влияют на количество фагоцитирующих *S. aureus* макрофагов и нейтрофилов.

2. КМ усиливают бактерицидный потенциал лейкоцитов, что выражается в увеличении поглотительной и переваривающей способности клеток, а также в усилении клетками продукции свободных радикалов.

3. Наиболее выраженные эффекты КМ проявляют в концентрациях 10–100 мкг/мл. В дозе 1000 мкг/мл КМ ингибируют функциональную активность лейкоцитов.

Вклад авторов

Планирование и выполнение экспериментов, обсуждение результатов, подготовка текста статьи – Милешина С.Е.; выполнение экспериментов, статистическая обработка результатов, обсуждение результатов – Николин А.А.; планирование экспериментов, выделение коллагена и получение коллагеновых матрикинов, обсуждение результатов, подготовка текста статьи – Козлов И.Г.

■ Литература

1. Maquart F.X., Bellon G., Pasco S., Monboisse J.C. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie*. 2005; 87 (3–4): 353–60. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.10.006
2. Gaggari A., Jackson P.L., Noerager B. D., O'Reilly Ph. J., McQuaid D.B., Rowe S.M. et al. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J. Immunol*. 2008; 180 (8): 5662–59. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5662
3. Amit G., Weathington N. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease. *J. Clin. Invest*. 2016; 126 (9): 3176–84. DOI: 10.1172/JCI83147.
4. Simeon A., Monier F., Emonard H., Wegrowski Y., Bellon G., Monboisse J.C. et al. Fibroblast-cytokine-extracellular matrix interactions in wound repair. *Curr. Top Pathol*. 1999; 93: 95–101. DOI: 10.1007/978-3-642-58456-5_10
5. Tran K.T., Lamb P., Deng J.S. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J. Dermatol. Sci*. 2005; 40: 11–20. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2005.05.001
6. Patel D.F., Snelgrove R.J. The multifaceted roles of the matrikine Pro-Gly-Pro in pulmonary health and disease. *Eur Respir Rev*. 2018; 27 (148): 180017. DOI: 10.1183/16000617.0017-2018
7. Klaus L., Zhichao F. Chapter 5: Leukocyte adhesion. In book: ed. Klaus Ley. *Inflammation. Fundamental mechanisms*. World scientific, 2018.
8. Choi H.R., Kang Y.A., Ryoo S.J., Shin J.W., Na J.I., Huh C.H., Park K.C. Stem cell recovering effect of copper-free GHK in skin. *Journal of Peptide Science*. 2012; 18 (11): 685–90. DOI: 10.1002/psc.2455
9. Gruchlik A., Chodurek E., Dzierzewicz Z. Influence of selected peptides and their copper complexes on antioxidant enzyme activities in human skin fibroblasts. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 2010; 27 (1): 29.
10. Fu S.-Ch., Cheuk Y.-Ch., Chiu W.-Y.V., Yung Sh.-H., Rolf Ch.G., Chan K.-M. Tripeptide-copper complex GHK-Cu (II) transiently improved healing outcome in a rat model of ACL reconstruction. *J. Orthop Res*. 2015; 33 (7): 1024–33. DOI: 10.1002/jor.22831
11. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. GHK peptide as a natural modulator of multiple cellular pathways in skin regeneration. *J. Biomed. Biotechnol*. 2015. DOI: 10.1155/2015/648108
12. Simeon A., Emonard H., Hornebeck W. et al. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/S0024-3205(00)00803-1
13. Smakhtin M.Y., Sever'yanova L.A., Konoplya A.I., Shveinov I.A. Tripeptide Gly-His-Lys is a hepatotropic immunosuppressor. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2002; 133 (6): 586–7. DOI: 10.1023/a:1020242127443
14. Pickart L., Vasquez-Soltero J. M., Margolina A. The effect of the human peptide GHK on gene expression relevant to nervous system function and cognitive decline *Brain Sci*. 2017; 7 (2): 20. DOI: 10.3390/brainsci7020020

15. Aldag C., Nogueira Teixeira D., Leventhal P.S. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: A review of the literature. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2016; 9: 411–9. DOI: 10.2147/CCID.S116158
16. Tsai W.-C., Hsu C.-C., Chung C.-Y., Lin M.-S., Li S.-L., Pang J.-H.S. The pentapeptide KTTKS promoting the expressions of type I collagen and transforming growth factor- β of tendon. 2007; (12): 1629–34. DOI: 10.1002/jor.20455
17. Schagen S.K. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics.* 2017; 4: 16.
18. Davis G.E., Bayless K.J., Davis M.J., Meininger G.A. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. of Pathol.* 2000; 156 (5): 1489–98. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65020-1
19. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial extracellular matrix. *Circulation Research.* 2005; 97 (11): 1093–107. DOI: 10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
20. Martinez-Lemus L.A., Wu X., Wilson E. et al. Integrins as unique receptors for vascular control. *J. Vasc. Res.* 2003; 40 (3): 211–33. DOI: 10.1159/000071886
21. Garnotel R., Monoboisse J.-C., Randoux A. et al. The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (46): 27495–503. DOI: 10.1074/jbc.270.46.27495
22. Pasala T., Sattayaprasert P., Bhat P.K., Athappan G., Gandhi S. Clinical and economic studies of eptifibatide in coronary stenting. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 2014; 10: 603–14. DOI: 10.2147/TCRM.S35664
23. Zamora A., Gandioso A., Massaguer A., Buenestado S., Calvis C., Hernández J.L. et al. Toward angiogenesis inhibitors based on the conjugation of organometallic platinum(II) complexes to RGD peptides. *ChemMedChem.* 2018; 13 (17): 1755–62. DOI: 10.1002/cmdc.201800282
24. Dou X., Nomoto T., Takemoto H., Tomoda M.M.K., Nishiyama N. Effect of multiple cyclic RGD peptides on tumor accumulation and intratumoral distribution of IRDye 700DX-conjugated polymers. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 8126. DOI: 10.1038/s41598-018-26593-0
25. Shuang L. Radiolabeled cyclic RGD peptide bioconjugates as radiotracers targeting multiple integrins. *Bioconjug Chem.* 2015; 26 (8): 1413–38. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00327
26. Maruyama S., Nonaka I., Tanaka H. Inhibitory effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related synthetic peptides on fibrinogen/thrombin clotting. *Bochim. Biophys. Acta.* 1993; 1164 (2): 215–8. DOI: 10.1016/0167-4838(93)90250-u
27. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А. Механизм иммунокорректирующего действия миелопида. *Иммунология.* 1998; 4: 27–9.
28. Koelink P.J., Overbeek S.A., Braber S., Morgan M.E., Henricks P.A.J., Roda M.A. et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2014; 63: 578–87. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303252
29. Wang L., Fuster M., Sriramarao P., Esko J.D. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2005; 6 (9): 902–10.
30. Hahn C.S., Scott D.W., Xu X., Abdul Roda M., Payne G.A., Wells J.M. et al. The matrikine N-a-PGP couples extracellular matrix fragmentation to endothelial permeability. *Science Advances.* 2015; 1 (3). DOI: 10.1126/sciadv.1500175
31. Laskin D.L., Soltys R.A., Berg R.A., Riley D.J. Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides. *Am. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1994 Jan; 10 (1): 58–64. DOI: 10.1165/ajrcmb.10.1.8292381
32. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н., Буна-тян Н.Д. и др. Москва : ЗАО «Гриф и К», 2012.
33. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб : Интермедика. 1999: 294–5.
34. Подосинников И.С., Нилова Л.Г., Бабаченко И.В. и др. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. *Лаб. Дело.* 1981; 8: 468–70.
35. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Пинегин Б.В. Оценка внутриклеточного киллинга стафилококка фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии. *Иммунология.* 2000; 2: 57–9.
36. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии. *Иммунология.* 2001; 4: 4–6.

■ References

1. Maquart F.X., Bellon G., Pasco S., Monboisse J.C. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie.* 2005; 87 (3–4): 353–60. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.10.006
2. Gaggari A., Jackson P.L., Noerager B.D., O'Reilly Ph.J., McQuaid D.B., Rowe S.M., et al. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J. Immunol.* 2008; 180 (8): 5662–9. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5662
3. Amit G., Weathington N. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease. *J. Clin. Invest.* 2016; 126 (9): 3176–84. DOI: 10.1172/JCI83147
4. Simeon A., Monier F., Emonard H., Wegrowski Y., Bellon G., Monboisse J.C., et al. Fibroblast-cytokine-extracellular matrix interactions in wound repair. *Curr Top Pathol.* 1999; 93: 95–101. DOI: 10.1007/978-3-642-58456-5_10
5. Tran K.T., Lamb P., Deng J.S. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J. Dermatol. Sci.* 2005; 40: 11–20. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2005.05.001
6. Patel D.F., Snelgrove R.J. The multifaceted roles of the matrikine Pro-Gly-Pro in pulmonary health and disease. *Eur. Respir. Rev.* 2018; 27 (148): 180017. DOI: 10.1183/16000617.0017-2018
7. Klaus L., Zhichao F. Chapter 5: Leukocyte adhesion. In book: ed. Klaus Ley. *Inflammation. Fundamental mechanisms.* World scientific, 2018.
8. Choi, H.R., Kang, Y.A., Ryoo, S.J., Shin, J.W., Na, J.I., Huh, C.H., Park, K.C. Stem cell recovering effect of copper-free GHK in skin. *Journal of Peptide Science.* 2012; 18 (11): 685–90. DOI: 10.1002/psc.2455
9. Gruchlik A., Chodurek E., Dzierzewicz Z. Influence of selected peptides and their copper complexes on antioxidant enzyme activities in human skin fibroblasts. *Postepy Dermatologii i Alergologii.* 2010; 27 (1): 29.
10. Fu S.-Ch., Cheuk Y.-Ch., Chiu W.-Y.V., Yung Sh.-H., Rolf Ch.G., Chan K.-M. Tripeptide-copper complex GHK-Cu (II) transiently improved healing outcome in a rat model of ACL reconstruction. *J. Orthop Res.* 2015; 33 (7): 1024–33. DOI: 10.1002/jor.22831
11. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. GHK peptide as a natural modulator of multiple cellular pathways in skin regeneration. *J. Biomed. Biotechnol.* 2015. DOI: 10.1155/2015/648108
12. Simeon A., Emonard H., Hornebeck W., et al. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci.* 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00803-1
13. Smakhtin M.Y., Sever'yanova L.A., Konoplya A.I., Shveinov I.A. Tripeptide Gly-His-Lys is a hepatotropic immunosuppressor. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2002; 133 (6): 586–7. DOI: 10.1023/a:1020242127443
14. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. The effect of the human peptide GHK on gene expression relevant to nervous system function and cognitive decline. *Brain Sci.* 2017; 7 (2): 20. DOI: 10.3390/brainsci7020020
15. Aldag C., Nogueira Teixeira D., Leventhal P.S. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: A review of the literature. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2016; 9: 411–9. DOI: 10.2147/CCID.S116158
16. Tsai W.-C., Hsu C.-C., Chung C.-Y., Lin M.-S., Li S.-L., Pang J.-H.S. The pentapeptide KTTKS promoting the expressions of type I collagen and transforming growth factor- β of tendon. 2007; (12): 1629–34. DOI: 10.1002/jor.20455
17. Schagen S.K. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics.* 2017; 4: 16.
18. Davis G.E., Bayless K.J., Davis M.J., Meininger G.A. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. of Pathol.* 2000; 156 (5): 1489–98. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65020-1

19. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial Extracellular matrix. *Circulation Research*. 2005; 97 (11): 1093–107. DOI: 10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
20. Martinez-Lemus L.A., Wu X., Wilson E., et al. Integrins as unique receptors for vascular control. *J. Vasc. Res.* 2003; 40 (3): 211–233. DOI: 10.1159/000071886
21. Garnotel R., Monoboisse J.-C., Randoux A., et al. The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (46): 27495–503. DOI: 10.1074/jbc.270.46.27495
22. Pasala T., Sattayaprasert P., Bhat P.K., Athappan G., Gandhi S. Clinical and economic studies of eptifibatide in coronary stenting. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 2014; 10: 603–14. DOI: 10.2147/TCRM.S35664
23. Zamora A., Gandioso A., Massaguer A., Buenestado S., Calvis C., Hernández J.L., et al. Toward angiogenesis inhibitors based on the conjugation of organometallic platinum(II) complexes to RGD peptides. *ChemMedChem*. 2018; 13 (17): 1755–62. DOI: 10.1002/cmdc.201800282
24. Dou X., Nomoto T., Takemoto H., Tomoda M.M.K., Nishiyama N. Effect of multiple cyclic RGD peptides on tumor accumulation and intratumoral distribution of IRDye 700DX-conjugated polymers. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 8126. DOI: 10.1038/s41598-018-26593-0
25. Shuang L. Radiolabeled cyclic RGD peptide bioconjugates as radiotracers targeting multiple integrins. *Bioconjug Chem.* 2015; 26 (8): 1413–38. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00327
26. Maruyama S., Nonaka I., Tanaka H. Inhibitory effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related synthetic peptides on fibrinogen/thrombin clotting. *Bochim. Biophys. Acta.* 1993; 1164 (2): 215–8. DOI: 10.1016/0167-4838(93)90250-u
27. Kirilina E.A., Mikhailova A.A., Malakhov A.A., Guryanov S.A., Efremov M.A. Mechanism of immunocorrection action of myelopid. *Immunologiya*. 1998; 4: 27–9. (in Russian)
28. Koelink P.J., Overbeek S.A., Braber S., Morgan M.E., Henricks P.A.J., Roda M.A., et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2014; 63: 578–87. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303252
29. Wang L., Fuster M., Sriramara P., Esko J.D. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2005; 6 (9): 902–10.
30. Hahn C.S., Scott D.W., Xu X., Abdul Roda M., Payne G.A., Wells J.M., et al. The matrikine N-a-PGP couples extracellular matrix fragmentation to endothelial permeability. *Science Advances*. 2015; 1 (3). DOI: 10.1126/sciadv.1500175
31. Laskin D.L., Soltys R.A., Berg R.A., Riley D.J. Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides. *Am. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1994; 10(1): 58–64. DOI: 10.1165/ajrcmb.10.1.8292381
32. Guidelines for preclinical drug research. Ed. Mironov A.N., Bunatyan N.D., et al, Moscow: ZAO «Grif i K», 2012. (in Russian)
33. Karpishchenko A.I. Medical laboratory technology. Reference book. Saint Petersburg: Intermedika. 1999: 294–5. (in Russian)
34. Podosinnikov I.S., Nilova L.G., Babachenko I.V., et al. Method for determining chemotactic activity of white blood cells. *Lab. Delo*. 1981; 8: 468–70. (in Russian)
35. Mazurov D.V., Dambaeva S.V., Pinegin B.V. Evaluation of Staphylococcus intracellular killing by peripheral blood phagocytes using flow cytometry. *Immunologiya*. 2000; 2: 57–59. (in Russian)
36. Khaitov R.M., Pinegin B.V. Assessment of the human immune status in normal and pathological conditions. *Immunologiya*. 2001; 4: 4–6. (in Russian)

Сведения об авторах

Милешина Светлана Евгеньевна – к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, доцент кафедры фармакологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: svetikshrv@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8082-9393>

Николин Алексей Александрович – к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: nikson111@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8082-9393>

Козлов Иван Генрихович – д.м.н., проф., заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, профессор Центра иммунологии и клеточных технологий ФГАОУ ВО БФУ им. И. Канта» Минобрнауки России, Калининград, профессор кафедры управления и организации лекарственного обеспечения ФДПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация; e-mail: immunopharmacology@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>

Authors' information

Svetlana E. Mileshina – PhD, Research Associate at the Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology of the Dmitry Rogachev NMRC PHOI of the MOH of Russia, Associate Prof. of the Department of Pharmacology, Pediatric Faculty of the N.I. Pirogov RNRMU MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: svetikshrv@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8082-9393>

Alexey A. Nikolin – PhD, Junior Researcher Associate at the Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology of the Dmitry Rogachev NMRC PHOI of the MOH of Russia, Associate Prof. of the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical Faculty of the N.I. Pirogov RNRMU of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: nikson111@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8579-2083>

Ivan G. Kozlov – MD, Prof., Head of the Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology of the Dmitry Rogachev NMRC PHOI of the MOH of Russia, Moscow, Prof. of the Center for immunology and cell technologies of I. Kant BFU of the MSHE, Kaliningrad, Prof. of the Department of management and organization of drug supply FPDE of I.M. Sechenov FMSMU of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; e-mail: immunopharmacology@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>