

И.В. МАЙБОРОДИН, В.В. МОРОЗОВ, Я.В. НОВИКОВА, В.А. МАТВЕЕВА,
Л.В. АРТЕМЬЕВА, А.Л. МАТВЕЕВ, С.В. ХОМЕНЮК, С.В. МАРЧУКОВ

УСКОРЕНИЕ РАЗВИТИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ГРАНУЛЯЦИЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВОЗЛЕ ТРОМБИРОВАННОЙ ВЕНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Центр новых медицинских технологий

Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск,
Российская Федерация

Цель. Оценить возможность паравазального применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения (АМСККП) для восстановления кровотока в тромбированной вене в эксперименте.

Материал и методы. Методами люминесцентной микроскопии изучали морфологические результаты введения АМСККП с трансфицированным геном GFP и дополнительно меченных красителем клеточных ядер DAPI рядом с тромбированной веной задней конечности крыс.

Результаты. В месте хирургического вмешательства, выполненного при моделировании тромбоза, было найдено множество сосудов, состоящих из специфически светящихся клеток. Восстановление кровотока в тромбированной магистральной вене всегда идет за счет тромболитика. Признаки встраивания АМСККП в стенку тромбированного сосуда не найдены. Реканализация тромба и формирование коллатералей также не обнаружены. При моделировании тромбоза в эксперименте введением тромбина и лигированием магистральной вены также происходит тромбирование ее мелких ветвей. В них восстановление кровотока происходит с привлечением введенных АМСККП или через реканализацию тромба, или через облитерацию тромбированных сосудов и прорастание новых. Таким образом, быстрее восстанавливается кровоток в тканевом регионе пораженной вены и уменьшается вероятность развития тканевых гипоксических некрозов и других осложнений. Постепенно введенные АМСККП и структуры, сформированные с их участием, вытесняются собственными клетками организма-реципиента.

Заключение. При введении АМСККП в паравазальную клетчатку магистральной тромбированной вены, они принимают участие в восстановлении тканевого кровотока в регионе тромбированной вены, а также в развитии грануляций в месте хирургического вмешательства, выполненного при моделировании тромбоза.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, венозный тромбоз, реканализация тромба, ангиогенез, восстановление кровотока

Objectives. To estimate the possibility of paravasal application of the autologous multipotent mesenchymal stem cells of a bone marrow origin (AMMSCBMO) for the blood flow restoration in a thrombosed vein in experiment.

Methods. The morphological results of the AMMSCBMO introduction with GFP transfected gene and DAPI cellular nuclei additionally marked with a dye near the thrombosed vein were studied by means of the fluorescence microscopy.

Results. Many vessels consisting of the specifically fluorescent cells were found out in the place of a surgical intervention performed at thrombosis modeling. The restoration of the blood flow in the thrombosed main vein is always the result of thrombolysis. The signs of AMMSCBMO embedding into the wall of thrombosed vessels haven't been found. The recanalization of the blood clot and formation of collaterals haven't been detected as well. At thrombosis modeling in experiment? thrombosis of the small branches occurs by introduction of thrombin and ligation of the main vein. In them restoration of blood flow occurs by involving introduced AMMSCBMO or through a blood clot recanalization or through the obliteration of thrombosed vessels and formation of new ones. Thus the restoration of the blood flow in the tissue region of the affected vein is quicker probability of development of tissue hypoxic necroses and other complications decreases. Gradually introduced AMMSCBMO and the structures generated with their participation, are extruded by own cells an organism-recipient.

Conclusions. At introduction of AMMSCBMO in paravasal cellulose of the main thrombosed vein, they take part in restoration of the tissue blood flow in the region of the thrombosed vein, and also in development of granulations in the place of the surgical intervention performed at thrombosis modeling.

Keywords: multipotent mesenchymal stem cells, venous thrombosis, recanalization of blood clot, angiogenesis, restoration of blood flow

Novosti Khirurgii. 2012; Vol 20 (6): 12-19

Acceleration of development of postoperative granulations after administration of mesenchymal stem cells near the thrombosed vein in experiment

I.V. Maiborodin, V.V. Morozov, Ja.V. Novikova, V.A. Matveeva,
L.V. Artemyeva, A.L. Matveev, S.V. Homeniuk, S.V. Marchukov

Введение

В настоящее время происходит постоянное увеличение числа пациентов с сосудистыми тромбозами [1]. Успех репаративных процессов во многом определяется развитием коллатерального кровотока и реканализацией самого тромба. Анализ причин неудачного лечения таких пациентов свидетельствует о том, что пути их преодоления состоят как в усовершенствовании технологии медикаментозного и хирургического лечения, так и в создании оптимальных условий для восстановления кровотока.

Красный костный мозг содержит прогениторные клетки (мезенхимальные стволовые клетки), способные к дифференцировке в эндотелиоциты и перicyты. Это позволяет широко применять такие клетки для ускорения ревазуляризации тканей с нарушенной микроциркуляцией [2, 3, 4]. Ревазуляризация тромба, быстрая реканализация вены и восстановление кровообращения в ишемизированных в результате тромбоза тканях были достигнуты в экспериментальных моделях с проангиогенными агентами [4, 5, 6].

В литературе имеется множество данных об эффективности использования клеточных технологий для стимуляции ангиогенеза. Однако, применение МСК как самостоятельно, так и в комбинации с другими препаратами и веществами, имеет свои недостатки и преимущества и должно осуществляться только с учетом всех возможных показаний и противопоказаний. В связи с вышеизложенным была поставлена следующая **цель** исследования: изучить возможность паравазального применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения (АМСККП) для восстановления кровотока в тромбированной вене в эксперименте.

Материал и методы

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

АМСККП 2 пассажа, полученные от крысы указанной линии, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., USA), содержащей ген зеленого флуоресцентного белка GFP под контролем про-

мотора цитомегаловируса и ген устойчивости к неомицину под контролем промотора вируса SV40, необходимого для последующей селекции с использованием дженетицина G418 (pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc., USA). Трансфекцию проводили в присутствии реагента для трансфекции TurboFect (Fermentas life sciences, Inc, Canada) согласно рекомендациям производителя, применяли протокол для трансфекции суспензионных клеток. Трансфекцию проводили, используя 1×10^6 клеток в 1 мл суспензии, 4 мкг ДНК плазмиды и 10 мкл реагента для трансфекции (TurboFect).

Через 4 часа после трансфекции клетки разводили не трансфицированными клетками в соотношении 1:2,5, соответственно, и использовали для введения экспериментальным животным. Оставшиеся после трансплантации клетки поддерживали в культуре в течение 1 месяца для оценки эффективности трансфекции и стабильности экспрессии введенного гена.

Экспрессию введенного гена GFP АМСККП крысы оценивали визуально под флуоресцентным микроскопом, непосредственно просматривая культуру или используя камеру Горяева для подсчета трансфицированных клеток через 48 часов после трансфекции. Эффективность трансфекции оценивали как процент светящихся клеток относительно всех клеток в камере Горяева. Процент трансфицированных клеток в разбавленной культуре составлял около 3%.

Как и в большинстве случаев при использовании технологии, основанной на введении плазмидной ДНК, наблюдали только временную экспрессию введенного гена зеленого флуоресцентного белка в АМСККП крысы. Культивирование клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1 без селекции (не использовали дженетицин (G418, Sigma, USA)) показало снижение количества клеток, синтезирующих зеленый флуоресцентный белок, вследствие их вытеснения нетрансфицированными клетками. Но даже спустя 1 неделю в культуре трансфицированных клеток 1 пассажа, высеянных из плотности 5000 клеток на 1 см², наблюдали клетки, синтезирующие зеленый флуоресцентный белок.

Кроме того, часть АМСККП с геном GFP, согласно инструкции производителя (Sigma, USA), инкубировали с красителем ядер клеток DAPI в концентрации 1 мг/мл среды α -MEM с 10% эмбриональной сывороткой телят, антибиотиком/антимикотиком (Gibco, USA) в CO₂-инкубаторе в атмосфере насыщенной влажности. Через 10 мин. среду сливали, клетки промывали физиологическим раствором в

модификации Дальбекко (БиолоТ, Россия) и заливали культуральной средой.

В доступной литературе содержится множество экспериментальных моделей венозного тромбоза. Однако, самым простым, самым воспроизводимым и наименее травматичным является метод S. Wessler et al. [7]: сочетание венозного застоя (например, лигирование вены) и гиперкоагуляции за счет введения активированного фактора свертывания (например, тромбина).

В асептических условиях скальпелем производили разрез кожи длиной до 3 см по внутренней стороне бедра от паховой складки. Тупым способом выделяли сосудистый пучок и накладывали лигатуру на *v. femoralis*, как можно ближе к месту впадения в *v. circumflexa ilium profunda*. В нижнюю треть *v. femoralis* вводили раствор тромбина (0,5 Ед/мл) до заполнения всего участка от места инъекции до места лигирования (0,03-0,05 мл). Место инъекции пережимали на 3 мин. (до формирования тромба) для исключения ретроградного распространения и элиминации введенного препарата через инъекционное отверстие. Через 1 сутки осуществляли повторный доступ к тромбированной вене и после удаления лигатуры по 50 мкл суспензии АМСККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл) вводили в ткани справа и слева (не далее 5 мм) от тромбированной вены. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 4 суток, 1, 2, 3, 4 и 5 недель после введения АМСККП. В каждой группе было 11-12 животных. В качестве контроля использовали интактных крыс, животных с венозным тромбозом без использования АМСККП и с паравазальным применением АМСККП без предварительного моделирования венозного тромбоза. Половине животных последней группы на сроки в 4 суток и 2 недели вводили АМСККП с геном GFP и ядрами, окрашенными DAPI.

V. femoralis с окружающими тканями фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов, обезживали в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Неокрашенные срезы толщиной 5-7 мкм изучали на световом микроскопе Axioimager M1 при увеличении до 1500 раз в режиме люминесценции с фильтрами Alexa 488 или DAPI.

Результаты

При исследовании методом люминес-

центной микроскопии у интактных животных и при тромбозе без последующего введения АМСККП на все сроки наблюдения специфическое свечение отсутствовало в стенке магистральных сосудов и в паравазальной клетчатке (рис. 1 а), в тканях вдали от сосудистого пучка и в сосудах, проходящих в массиве мышц бедра.

Через 4 суток в качестве контроля возле нормальной вены были введены АМСККП не только меченные GFP, но и с параллельной меткой клеточных ядер DAPI.

Было обнаружено, что в паравазальной клетчатке присутствовали единичные специфически светящиеся клетки. В некоторых случаях эти клетки были выстроены в короткие цепочки. Несколько реже были найдены небольшие группы мелких сосудов (грануляции), стенки которых полностью состояли из светящихся клеток (рис. 2, 1 ряд). Использование двойной метки введенных АМСККП позволило доказать их участие в ангиогенезе: при использовании фильтра «Alexa 488» в клетках ярким зеленым цветом светилась цитоплазма и оставалось темным ядро, при применении фильтра «DAPI» ядро светилось синим цветом, что было хорошо видно после совмещения результатов исследования с разными фильтрами для ультрафиолетового света (рис. 2, 1 ряд).

Через 4 суток после тромбирования вены и введения АМСККП, в ткани вокруг сосуда, непосредственно в самой вене сохранялись только остатки тромба, большая часть просвета такого сосуда была свободна. Фрагменты тромба на большом протяжении располагались на стенке сосуда (пристеночный тромбоз), были уже фрагментированы на более мелкие остатки и инфильтрированы крупными клетками, скорее всего, макрофагами.

В тканях вокруг сосуда, в грануляциях на месте хирургического вмешательства было обнаружено множество отдельно расположенных клеток со специфическим свечением в цитоплазме (рис. 1 б). Иногда в тканях на месте операции были обнаружены группы мелких сосудов капиллярного типа (грануляции), в стенке которых присутствовали светящиеся клетки (рис. 1 б). В некоторых случаях можно было четко проследить специфическое свечение в цитоплазме и более темное ядро (рис. 1 б).

На срок в 1 неделю после инъекции АМСККП рядом с нормальной веной в паравазальной клетчатке и остатках послеоперационных грануляций присутствовали единичные сосуды со специфически светящимися клетками (рис. 1 в). В некоторых случаях были найдены группы светящихся мелких сосудов капил-

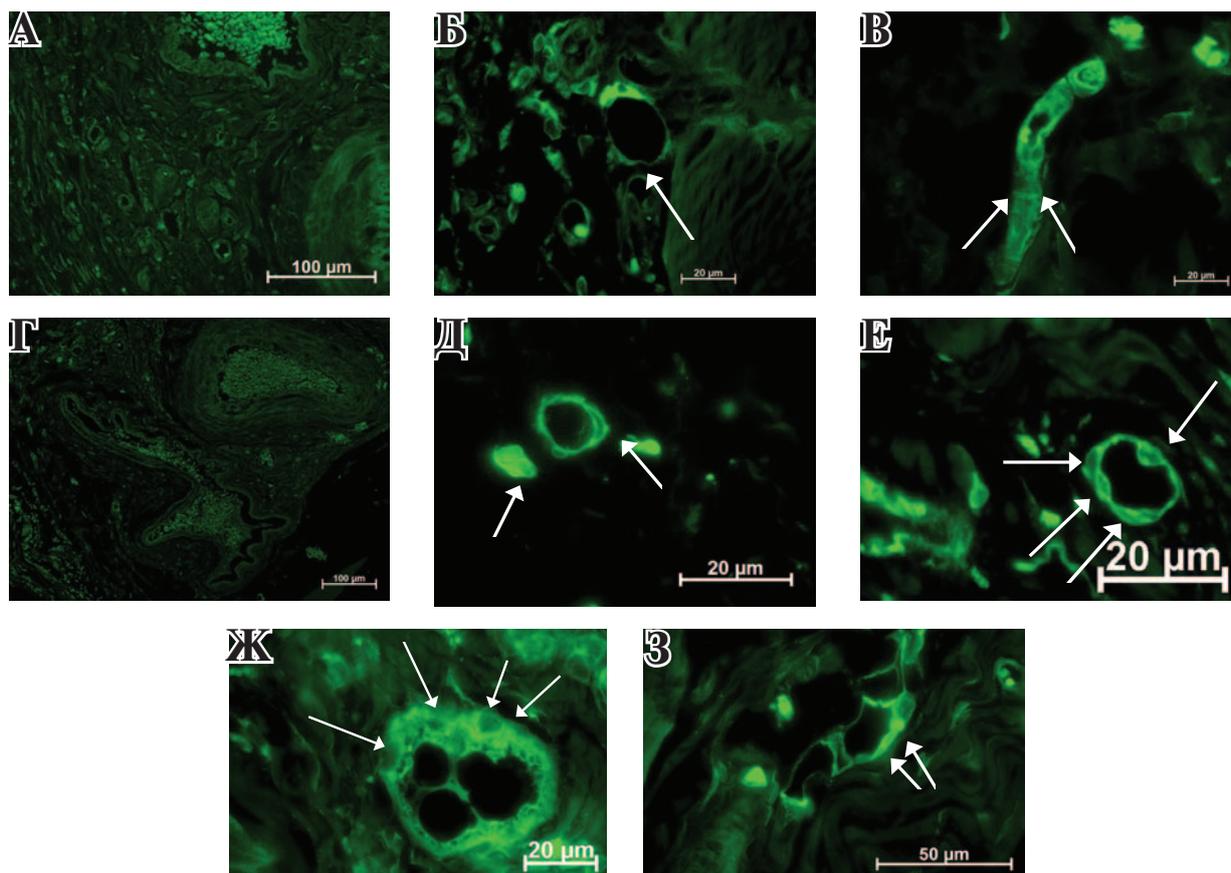


Рис. 1. Участие АМСККП в ангиогенезе после их введения в ткани рядом с нетромбированной и тромбированной веной. Неокрашенные срезы в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром «Alexa 488».

А – Специфическое свечение отсутствует в стенке магистральных сосудов и сосудов паравазальной клетчатки интактного животного.

Б – Через 4 суток после введения АМСККП рядом с тромбированной веной в стенке сосуда четко видно специфическое свечение в клеточной цитоплазме и темное ядро (стрелка).

В – В грануляциях и формирующемся рубце на месте операции спустя 1 неделю после введения АМСККП рядом с нормальной веной присутствует множество мелких сосудов со специфически светящимися стенками и отдельными клетками в них. В ряде случаев видны более темные ядра светящихся клеток (стрелки).

Г – На 1 неделе после введения АМСККП рядом с тромбированной веной в ней содержатся фрагменты пристеночного тромба. Светящихся объектов в тромбе и стенке вены нет.

Д – На месте операции к исходу 1 недели после введения АМСККП рядом с тромбированной веной присутствуют сосуды и их группы со специфическим свечением в цитоплазме, на фоне ярко светящейся цитоплазмы видно более темное ядро (стрелки).

Е – Через 2 недели после введения АМСККП рядом с тромбированной веной в паравазальной клетчатке расположены группы сосудов со специфическим свечением. На фоне ярко светящейся цитоплазмы клеток в сосудистой стенке видны более темные ядра (стрелки). Рядом со светящимися сосудами расположены сосуды без свечения.

Ж – Светящийся тромбированный сосуд в момент реканализации тромба присутствует в мышцах бедра спустя 2 недели после введения АМСККП рядом с тромбированной веной. Стенка сосуда утолщена, в ней расположены крупные клетки с темным ядром и более яркой цитоплазмой (стрелки). Просвет сосуда выполнен гетерогенными массами с большими отверстиями и перетяжками между ними.

З – На 3 неделе после введения АМСККП рядом с тромбированной веной в ткани послеоперационного рубца содержатся небольшие группы сосудов со специфически светящимися стенками. В ряде случаев видны более темные ядра клеток (стрелки).

лярного типа. Иногда удается проследить более темные ядра светящихся клеток (рис. 1 в).

После тромбирования вены и введения АМСККП в ткани вокруг сосуда тромб почти полностью лизирован и от него остались толь-

ко мелкие пристеночные фрагменты. Ни у одного животного светящихся объектов в стенке тромбированной вены не найдено (рис. 1 г).

В тканях на месте операции были отмечены мелкие сосуды, стенка которых содержала

светящиеся клетки. Такие сосуды были крупнее, и их стенка была толще, чем на предыдущий срок (рис. 1 д). В некоторых случаях можно было четко проследить яркое специфическое свечение в цитоплазме и темное ядро (рис. 1 д).

Через 2 недели после введения АМСККП параллельно меченных GFP и ядерным красителем DAPI возле интактной вены в большинстве наблюдений в паравазальной клетчатке и в послеоперационном рубце присутствовали единичные специфически светящиеся клетки. Также были найдены небольшие группы мелких сосудов, в стенке которых были обнаружены светящиеся объекты. При использовании фильтра Alexa 488 в таких клетках ярко светилась зеленая цитоплазма и оставалось темным ядро, а при применении фильтра DAPI - было отмечено специфическое синее свечение ядра (рис. 2, 2 ряд).

Через 2 недели после введения АМСККП рядом с тромбированной веной проходимость всех сосудов была практически восстановлена. Ни у одного животного светящихся объектов в стенке тромбированной вены не обнаружено.

Количество сосудов со светящимися клетками в клетчатке возле сосудистого пучка уменьшилось, практически исчезли структуры, похожие на грануляции. Очень редко в клетчатке были обнаружены группы сосудов с клетками, которые имели специфическое свечение в цитоплазме (рис. 1 е).

На предыдущие точки не было отмечено, но появилось на этот срок специфическое свечение стенки отдельных сосудов венозного типа, расположенных в массиве мышечной ткани бедра. Практически всегда сосуды со специфическим свечением имели широкий просвет, в некоторых случаях в котором находились остатки тромба с макрофагами. Иногда такие сосуды с тромбом имели характерный для процесса реканализации вид. Стенка сосуда была утолщена, в ней можно отметить крупные клетки с темным ядром и светящейся цитоплазмой (рис. 1 ж). Просвет сосуда заполнен гетерогенными массами с большими отверстиями и перетяжками между ними, скорее всего, остатками частично лизированного тромба (рис. 1 ж).

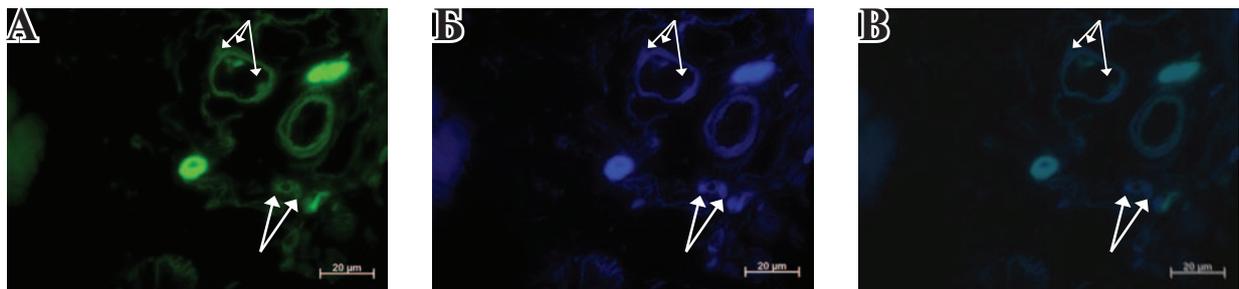
На срок в 3, 4 и 5 недель после введения

Рис. 2. Ангиогенез в послеоперационных грануляциях после введения АМСККП, меченных GFP и ядерным красителем DAPI, рядом с нетромбированной веной. А – Неокрашенный срез в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром «Alexa 488». Б – Неокрашенный срез в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром «DAPI». В – Результат компьютерного совмещения рис. «А» с рис. «Б».

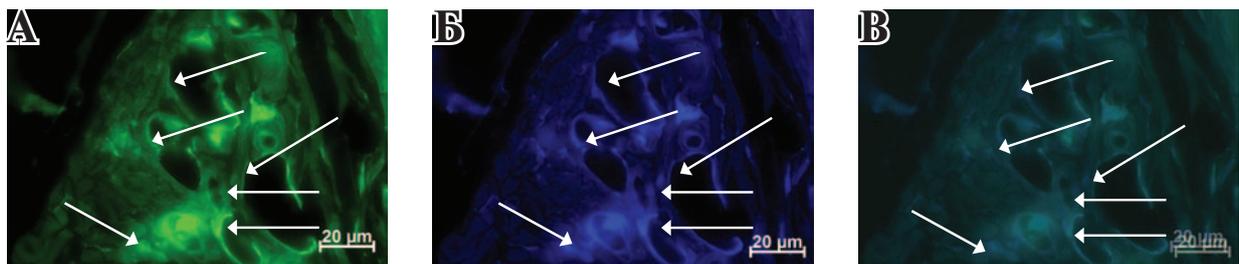
1 ряд – Через 4 суток после введения АМСККП в месте хирургического вмешательства присутствуют небольшие группы мелких сосудов, стенки которых состоят из светящихся клеток. Иногда на фоне светящейся зеленой цитоплазмы видны более темные ядра, окрашенные при использовании фильтра «DAPI» в синий цвет (стрелки).

2 ряд – Спустя 2 недели после инъекций АМСККП в грануляциях на месте операции расположены группы мелких сосудов, в стенке которых содержатся единичные светящиеся зеленым цветом клетки, в которых прослеживаются более темные ядра, окрашенные синим цветом при применении фильтра «DAPI» (стрелки).

1 ряд



2 ряд



АМСККП около нормального сосуда в стенке вены, в паравазальной клетчатке и в месте хирургического вмешательства не было найдено специфически светящихся объектов.

После операции по моделированию венозного тромбоза и введения АМСККП рядом с пораженной веной, как и на более ранние сроки, ни у одного животного светящихся объектов в стенке тромбированной вены не найдено, также не было обнаружено фрагментов тромба в ее просвете.

Основное место как в паравазальной клетчатке, так и в рубцовой ткани на месте хирургического вмешательства и грануляций занимали сосуды без специфического свечения в своих структурах. Значительно реже и только на срок в 3 недели были найдены группы сосудов со специфическим свечением в стенке, но эти группы были небольшими (рис. 13). В таких сосудах можно было проследить на фоне ярко светящейся клеточной цитоплазмы темное ядро (рис. 1 з).

Обсуждение

Несмотря на многочисленные литературные данные о положительных результатах применения клеточных технологий в лечении сосудистых тромбозов [2, 3, 4], согласно нашим результатам восстановление кровотока в тромбированной магистральной вене в эксперименте на крысах всегда идет за счет тромболизиса, приводящего уже к 4 суткам к рассасыванию большей, значительной части тромба в магистральной вене. Признаки встраивания АМСККП в стенку тромбированного сосуда не найдены ни в одном случае на все сроки эксперимента. Признаки реканализации тромба и формирования коллатералей также не обнаружены.

При паравазальном введении АМСККП без предварительного тромбирования вены в месте хирургического вмешательства было отмечено появление групп мелких сосудов, построенных из клеток с ярко светящейся зеленым цветом цитоплазмы при использовании фильтра Alexa 488 и светящимся синим цветом ядом при применении фильтра DAPI.

То есть, уже к 4 суткам в грануляциях, развивающихся на месте хирургической травмы, содержатся сосуды, сформированные из введенных АМСККП. Рост сосудов происходит как в результате прорастания уже имеющихся в регионе сосудов, так и за счет неогенеза с привлечением клеток-предшественников из костного мозга [8, 9, 10]. При введении АМСККП они сразу начинают встраиваться в

растущие сосуды и формировать новые в результате дифференцировки эндотелиоциты и перicyты [11, 12, 13].

Начиная со срока в 1 неделю после инъекции АМСККП рядом с нормальной веной, количество светящихся клеток и сосудов, построенных из них, в месте хирургического вмешательства постепенно уменьшается, а с 3 недели светящихся объектов практически нет. Это, наиболее вероятно, связано с заживлением раны и инволюцией грануляций.

После введения АМСККП на фоне сосудистого тромбоза на эти сроки в послеоперационных грануляциях присутствовало множество отдельно расположенных клеток со специфическим свечением в цитоплазме или группы мелких сосудов капиллярного типа, стенки которых состояли из клеток со светящейся цитоплазмой и более темным ядром. Количество сосудов со светящимися объектами в стенке постепенно нарастало, стенки их становились толще.

Доказательством того, что указанные группы сосудов были сформированы именно в результате введения АМСККП и из них, является свечение клеточной цитоплазмы. Ген GFP, введенный в ДНК АМСККП, неизменным передается дочерним клеткам и клеткам следующих поколений. Эти клетки и структуры, сформированные из них, точно также светятся в отраженном ультрафиолетовом свете.

Таким образом, экономится время на миграцию собственных плюрипотентных клеток к месту операции и ускоряются процессы развития грануляций.

С точки зрения эксперимента в 2 недели количество сосудов со светящимися клетками в клетчатке возле сосудистого пучка начинает уменьшаться, постепенно исчезают структуры, похожие на грануляции. В основном, там присутствовали сосуды без светящихся объектов в стенке и только в отдельных случаях в сосудистой стенке среди обычных клеток были найдены клетки со свечением.

На ранние сроки эксперимента не было отмечено, но появилось на этот срок специфическое свечение стенки сосудов венозного типа, расположенных в массиве мышечной ткани бедра. Практически всегда сосуды со специфическим свечением имели широкий просвет. Иногда в мышечной ткани бедра были найдены сосуды с широким просветом, в котором находились остатки тромба с макрофагами.

Патогенез тромбирования мелких сосудов, проходящих в мышечной ткани бедра после введения тромбина, скорее всего, точно такой

же, как и крупного. После введения тромбина, он присутствует не только в самом сосуде, но и распространяется ретроградно (вследствие перевязки магистралей и нарушения оттока) на его ветви, осуществляющие сбор крови от тканей. В результате этого происходит тромбообразование не только магистральной вены, но и ее более мелких ветвей.

Далее в магистральной вене тромб лизируется, а в мелких сосудах фибрин организуется и постепенно поглощается макрофагами, которые даже могут образовывать гигантские клетки инородных тел [14, 15], что часто приводит к облитерации просвета такого сосуда. Затем или рядом развиваются новые сосуды или питание мышечной ткани осуществляется за счет уже имеющихся коллатералей. Яркое свечение эндотелия в сосуде в момент его реканализации может свидетельствовать о восстановлении структур сосудистой стенки и роста эндотелия по отверстиям в тромбе с участием АМСККП.

К 3 неделе завершается репарация тканей, и полностью формируется рубец на месте операции. Численность сосудов, в стенке которых имеются светящиеся объекты, начинает сокращаться. Также уменьшается интенсивность свечения клеток в сосудистой стенке. В основном, в тканях возле сосудов присутствовали только единичные сосуды со светящимися клетками в различных слоях стенки.

Не всегда постепенное исчезновение свечения в стенке сосудов не означает, что появились новые сосуды, построенные с участием собственных стволовых клеток, а сосуды сформированные с привлечением введенных АМСККП исчезли. По-видимому, сначала сосуды в паравазальной клетчатке и грануляциях образуются с участием привнесенных извне АМСККП. Постепенно, с исчезновением грануляций, на таких участках исчезают и сосуды, сформированные из клеток с белком GFP. В клетчатке рядом с сосудистым пучком сначала сосуды также образуются с привлечением светящихся клеток, однако, затем пусть и аутологичные, но все-таки взятые у другой особи АМСККП (и клетки, в которые дифференцировались введенные АМСККП), которые кроме всего прочего имеют чужеродный ген GFP, постепенно замещаются собственными клетками.

Заключение

Таким образом, на основании вышеизложенного, можно заключить, что при введении АМСККП в паравазальную клетчатку тром-

бированной вены, они принимают участие в развитии грануляций в месте хирургического вмешательства, выполненного при моделировании тромбоза. Восстановление кровотока в тромбированной магистральной вене всегда идет за счет тромболитика. Признаки встраивания АМСККП в стенку тромбированного сосуда не найдены ни в одном случае. Реканализация тромба и формирование коллатералей также не обнаружены. При моделировании тромбоза в эксперименте введением тромбина и лигированием магистральной вены также происходит тромбообразование ее мелких ветвей, находящихся в тканевом регионе. В них восстановление кровотока происходит с привлечением введенных АМСККП или через реканализацию тромба или через облитерацию тромбированных сосудов и прорастание новых. Постепенно введенные АМСККП и структуры, сформированные с их участием, вытесняются собственными клетками организма-реципиента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследование генных и клеточных подходов в терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы или опорно-двигательного аппарата» (ГК16.512.11.2099 «Исследование возможности использования генных и клеточных подходов в диагностике, профилактики и лечении тромбоэмболических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний для снижения уровня смертности и ранней инвалидизации трудоспособного населения РФ»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевченко Ю. Л. Основы клинической флебологии / Ю. Л. Шевченко, Ю. М. Стойко, М. И. Лыткина. — М. : Медицина, 2005. — 312 с.
2. Middle-term outcome of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation for treatment of lower limb ischemia / Y. Gu [et al.] // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. — 2009. — Vol. 23, N 3. — P. 341–44.
3. Transplantation of VEGF165-gene-transfected endothelial progenitor cells in the treatment of chronic venous thrombosis in rats / Q. Y. Meng [et al.] // Chin Med J (Engl). — 2010. — Vol. 23, N 4. — P. 471–77.
4. Changes of endothelial progenitor cells in rats after bone-marrow stimulation / Z. Tong [et al.] // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. — 2008. — Vol. 22, N 10. — P. 1218–21.
5. Chen Y. K. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor enhanced the resolution of venous thrombi / Y. K. Chen [et al.] // J Vasc Surg. — 2008. — Vol. 47, N 5. — P. 1058–65.
6. Cell-based therapy facilitates venous thrombus reso-

- lution / S. D. Santo [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2009. – Vol. 101, N 3. – P. 460–64.
7. Wessler S. Biological assay of a thrombosis inducing activity in human serum / S. Wessler, S. M. Reimer, M. C. Sheps // *J Appl Physiol.* – 1959. – Vol. 14. – P. 943–46.
8. Carmeliet P. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis / P. Carmeliet, A. Lutun // *Thromb Haemost.* – 2001. – Vol. 86, N 1. – P. 289–97.
9. Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog / Q. Shi [et al.] // *J Vasc Surg.* – 1994. – Vol. 20, N 4. – P. 546–57.
10. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells / Q. Shi [et al.] // *Blood.* – 1998. – Vol. 92, N 2. – P. 362–67.
11. Морфологический анализ результатов введения аутологичных стволовых стромальных клеток костномозгового происхождения в рубец матки крыс / И. В. Майбородин [и др.] // *Морфология.* – 2010. – Т. 138, № 6. – С. 47–55.
12. Ангиогенез в рубце матки крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения / И. В. Майбородин [и др.] // *Бюл. эксперим. биологии и медици-*

- ны.* – 2010. – Т. 150, № 12. – С. 705–11.
13. Angiogenesis in rat uterine scar after introduction after autologous mesenchymal stem cells of bone marrow origin / I. Maiborodin [et al.] // *J Biomedical Science and Engineering.* – 2011. – Vol. 4, N 3. – P. 164–72.
14. Гранулематозное воспаление после применения препаратов фибрина / И. В. Майбородин [и др.] // *Морфол. ведомости.* – 2007. – Т. 1. – № 3-4. – С. 116–18.
15. Морфология подлежащих тканей десны после дентальной имплантации с применением препаратов фибрина / И. В. Майбородин [и др.] // *Стоматология.* – 2009. – Т. 88, №1. – С. 9–13.

Адрес для корреспонденции

630090, Российская Федерация,
г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, д. 8,
Институт химической биологии
и фундаментальной
медицины СО РАН,
Центр новых медицинских технологий,
лаборатория стволовой клетки,
тел. моб.: +7 913 753-07-67,
e-mail: imai@mail.ru,
Майбородин Игорь Валентинович

Сведения об авторах

Майбородин И.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Морозов В.В., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Новикова Я.В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории инвазивных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Матвеева В.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО

РАН, г. Новосибирск.

Артемьева Л.В., ведущий инженер лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Матвеев А.Л., аспирант лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Хоменюк С.В., научный сотрудник лаборатории инвазивных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Марчуков С.В., аспирант лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Поступила 17.09.2012 г.