

МАРЧУКОВ Сергей Вадимович

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ВЕНОЗНОГО
ТРОМБОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.01 – анатомия человека

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Майбородин Игорь Валентинович

доктор медицинских наук, профессор

Морозов Виталий Валерьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Склянов Юрий Иванович

(Новосибирский государственный медицинский университет, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии педиатрического факультета)

доктор медицинских наук, профессор

Горчаков Владимир Николаевич

(НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск, заведующий лабораторией функциональной морфологии лимфатической системы)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, 52, тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, 52)

Автореферат разослан «_____» _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время происходит постоянное увеличение числа больных с сосудистыми тромбозами. Около 30 % пациентов, перенесших тромбоз сосудов головного мозга, погибают в ближайший месяц, а еще у 20 % в течение 3 месяцев развивается рецидив заболевания (Шевченко Ю.Л. и др., 2005). Реваскуляризация пораженных вследствие сосудистого тромбоза тканей проходит двумя основными путями: развитием коллатерального кровотока и реканализацией самого тромба. Оба этих процесса протекают в течение времени, очень часто, в случае поражения магистральных сосудов, достаточного для некротизирования заинтересованных тканей и, даже, органов и конечностей.

Красный костный мозг содержит мезенхимальные стволовые клетки (МСК), способные к дифференцировке в эндотелиоциты и перициты (Cho H., et al., 2003; Carmeliet P., 2004; Bergers G., Song S., 2005). Это позволяет широко применять такие клетки для ускорения реваскуляризации тканей с нарушенной микроциркуляцией (Modarai B. et al., 2008; Gu Y. et al., 2009; Meng Q.Y. et al., 2010). Реваскуляризация тромба, быстрая реканализация вены и восстановление кровообращения в ишемизированных в результате тромбоза тканях были достигнуты в экспериментальных моделях с проангиогенными агентами (Tong Z. et al., 2008; Chen Y.K. et al., 2008; Santo S.D. et al., 2009).

Y. Gu и соавт. (2009) получили положительные среднесрочные результаты аутологичной трансплантации костномозговых моноклеарных клеток при лечении ишемии нижних конечностей у людей. У пациентов в общей сложности было забрано 400 мл костного мозга из верхнего заднего гребня подвздошной кости. Затем были выделены моноклеары. Количество трансплантируемых моноклеарных клеток костного мозга было $(0,6-1,8) \times 10^9$, в среднем $1,05 \times 10^9$.

Для восстановления поврежденного эндотелия и предотвращения отсроченного тромбоза артериального стента был апробирован на кроликах новый метод адресной доставки МСК с использованием ультразвука. использовали МСК с электростатическим покрытием из катионоактивных газонаполненных липидных микропузырьков, клетки вводили внутриаортально. После применения ультразвука (1,7 МГц) была показана максимальная адгезия МСК в месте повреждения. МСК сохранялись в просвете стента и через 24 часа после воздействия (Toma C. et al., 2011).

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что в доступной литературе приводятся только косвенные данные о возможности

применения МСК для реканализации тромба или ускоренного роста коллатералей в ишемизированных тканях, но отсутствуют результаты исследований, четко доказывающие рост сосудов в тканевом регионе тромбоза после введения МСК.

Цель исследования. Изучить результаты применения аутологичных мезенхимальных плюрипотентных стромальных клеток костномозгового происхождения (АМСККП) для восстановления микроциркуляции в регионе тромбированной вены в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Методами световой микроскопии исследовать процессы восстановления микроциркуляции в тканевом регионе тромбированной магистральной вены в условиях использования АМСККП.
2. Изучить восстановление микроциркуляции в тканевом регионе тромбированной магистральной вены в условиях использования АМСККП.
3. Сравнить эффективность паравазального и внутривенного введения АМСККП в условиях экспериментального венозного тромбоза.
4. Выяснить судьбу АМСККП, введенных в регион тромбированной вены.

Научная новизна. Впервые показано, что при моделировании тромбоза введением тромбина и лигированием магистральной вены в эксперименте на крысах восстановление кровотока всегда идет за счет тромболизиса. Признаки реканализации тромба и формирования коллатералей отсутствуют.

Впервые обнаружено, что при экспериментальном тромбозе вместе с формированием тромба в магистральной вене также тромбируются ее мелкие ветви, находящиеся в тканях. В этих сосудах восстановление кровотока происходит или через реканализацию тромба или через облитерацию тромбированных сосудов и прорастание новых.

Впервые продемонстрировано, что АМСККП участвуют в процессе реканализации тромбированных и прорастании новых ветвей магистральной вены, что приводит к более быстрому восстановлению кровотока в тканевом микрорайоне.

Впервые доказано, что для восстановления микроциркуляции эффективно и паравазальное и внутривенное введение АМСККП. При моделировании венозного тромбоза без последующей коррекции показатели площади и числа сосудов на срезе тканей увеличены до 4 недели после введения тромбина. После введения АМСККП в тромбированную вену и паравазально от нее васкуляризация максимальна уже на 2 неделе после операции и остается

практически на том же уровне до 4 недели, но даже спустя 5 недель это показатель выше исходного. Однако после внутривенной инъекции АМСККП в тканях найдено значительно больше сосудов с присутствием в стенке введенных АМСККП, чем после введения их паравазально.

Впервые получены данные, что при введении АМСККП в паравазальную клетчатку они принимают участие в развитии грануляций в месте хирургического вмешательства.

Впервые найдено, что АМСККП после инъекции в тромбированную вену или рядом с ней не мигрируют и не разрушаются в месте введения, а формируют кровеносные сосуды тканей и грануляций за счет дифференцировки в структуры их стенок. Постепенно введенные АМСККП и структуры, сформированные с их участием, вытесняются собственными клетками организма-реципиента.

Теоретическое и практическое значение работы. Получены новые знания об особенностях восстановления кровотока при тромбозе магистральной вены в условиях применения АМСККП. В связи с тем, что после использования АМСККП более быстро восстанавливается кровоток в тканевом микрорайоне тромбированной вены, о чем свидетельствует участие АМСККП в реканализации тромбов и большое число молодых сосудов с присутствием в стенке инъецированных АМСККП, целесообразно введение АМСККП непосредственно в тромбированную вену при коррекции тромботических состояний. В результате применения АМСККП раньше и быстрее развиваются грануляции в месте хирургического вмешательства, что может способствовать более быстрому очищению раны от детрита, нежизнеспособных тканей и антигенных веществ, раннему развитию репарационных процессов и быстрому заживлению тканей в месте хирургического вмешательства.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. При моделировании тромбоза введением тромбина и лигированием магистральной вены в эксперименте на крысах восстановление кровотока всегда идет за счет тромболизиса. В тромбированных мелких ветвях восстановление кровотока происходит или через реканализацию тромба или через облитерацию тромбированных сосудов и прорастание новых.

2. АМСККП участвуют в процессе реканализации тромбированных и прорастании новых ветвей магистральной вены, что приводит к более быстрому восстановлению кровотока в тканевом микрорайоне. При введении АМСККП в паравазальную клетчатку они также принимают участие в развитии грануляций в месте хирургического вмешательства.

3. АМСККП после инъекции в тромбированную вену или рядом с ней не мигрируют и не разрушаются в месте введения, а формируют кровеносные сосуды тканей и грануляций за счет дифференцировки в структуры их стенок.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертации доложены на Всероссийской конференции «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2011), международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты воспаления» (Минск, 2011), межлабораторной конференции сотрудников Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Новосибирского государственного медицинского университета.

Внедрение результатов исследования в практику. Полученные результаты используются в научно-исследовательском процессе Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (Новосибирск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из которых 3 входят в перечень в рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, собственных результатов с их обсуждением, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 171 странице машинописного текста, содержит 9 таблиц, иллюстрирована 38 многокомпонентными комбинированными рисунками. Список литературы включает 263 источника (47 отечественных и 216 иностранных). Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа основана на результатах морфологического исследования процессов восстановления венозного оттока в задней конечности с искусственно вызванным тромбозом магистральной вены в разные сроки после введения АМСККП крысам-самцам инбредной линии Wag возрастом 6 месяцев и весом 180-200 г. Все манипуляции с животными осуществляли под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». На работу получено разрешение Локального комитета по медицинской этике Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (протокол № 21 от

28.09.2012).

АМСККП выделяли, вымывая костный мозг из эпифизов бедренных костей у крыс-самцов линии Wag. Полученную суспензию клеток помещали в пластиковые флаконы («Nunk», Дания), через 48 ч после эксплантации костного мозга неприкрепившиеся клетки сливали. Прикрепившиеся клетки культивировали в среде α -МЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Biolot», Россия) при 37 °С в CO₂-инкубаторе с 5 % CO₂ в условиях насыщенной влажности. Смену среды производили каждые три дня. При субкультивировании монослойную культуру рассевали в плотности 1000–5000 клеток/см² (в зависимости от ростовых свойств используемой эмбриональной сыворотки), используя стандартные растворы Версена и трипсина.

АМСККП 2 пассажа трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., USA), содержащей ген зеленого флуоресцентного белка GFP под контролем промотора 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 1x10⁶ клеток в 1 мл суспензии, 4 мкг ДНК плазмиды и 10 мкл реагента для трансфекции (TurboFect). Через 4 часа после трансфекции клетки разводили нетрансфицированными клетками в соотношении 1 : 2,5, соответственно, и использовали для введения экспериментальным животным.

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 -МЕМ с 10 % эмбриональной сывороткой теленка, антибиотиком/антимикотиком (Gibco, USA) в CO₂-инкубаторе в атмосфере насыщенной влажности. Через 10 минут среду сливали, клетки промывали физиологическим раствором в модификации Дальбекко (БиолоТ., Россия) и заливали культуральной средой.

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 минуты (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 50 мкл суспензии АМСККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл) вводили непосредственно в тромбированную вену или по 50 мкл такой же суспензии АМСККП инъецировали 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 внутривенным или 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 (pH 7,4) не менее 24 часов, обезвоживали 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.

Для исследования относительной площади и численной плотности мелких и средних сосудов (площадь просвета до 250 мкм^2) в тканях рядом с тромбированной веной и в области хирургического вмешательства применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. Для изучения показателей васкуляризации (использование объектива с увеличением X 5) конечная площадь тестового квадрата была равна 16900 мкм^2 (сторона квадрата 130 мкм). Статистическую обработку результатов проводили на прикладной статистической программе MS Excel (Microsoft, USA), определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Различия между средними считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток для коррекции венозного тромбоза. При исследовании методом люминесцентной микроскопии у интактных животных, при тромбозе без последующего введения АМСККП и после внутривенной инъекции АМСККП

без предварительного моделирования тромбоза на все сроки наблюдения специфическое свечение отсутствовало в стенке магистральных сосудов и в паравазальной клетчатке, в тканях вдали от сосудистого пучка и в сосудах, проходящих в массиве мышц бедра.

Через 4 суток после моделирования тромбоза без и после использования АМСККП в 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 мелкие остатки и инфильтрированы крупными клетками, скорее всего, макрофагами. Спустя 1 неделю только в единичных случаях в вене присутствовали фрагменты пристеночного тромба, а на более отдаленные сроки признаков тромбоза магистральной вены обнаружено не было. После инъекции АМСККП в тромбированную вену или рядом с ней клетки со специфическим свечением в ее стенке найдены не были на все сроки наблюдения.

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. 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.

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

После введения АМСККП в тромбированную вену крайне редко в послеоперационных грануляциях присутствовали небольшие группы сосудов

капиллярного типа, стенки которых состояли из клеток со светящейся цитоплазмой и темным ядром. Необходимо обратить внимание еще на один результат. Моделирование тромбоза осуществляли лигированием сосуда на одни сутки и введением тромбина непосредственно после перевязки. Кроме тромбирования одного заинтересованного крупного сосуда произошло формирование тромбов в его мелких ветвях, проходящих в толще мышц бедра. Проходимость таких мелких сосудов к моменту исследования еще не была восстановлена. В их просвете, в паравазальной клетчатке и в тканях между сосудами были найдены единичные, небольшие, часто овальные специфически светящиеся объекты, возможно, сосуды, прорастающие через тромб в просвете сосуда (реканализация тромба), и сосуды, формирующиеся рядом с тромбированными для осуществления коллатерального кровотока.

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. В некоторых случаях были найдены группы светящихся мелких сосудов капиллярного типа. Иногда удастся проследить более темные ядра светящихся клеток.

После тромбирования вены и введения АМСККП в ткани вокруг сосуда 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. В некоторых случаях можно было четко проследить яркое специфическое свечение в цитоплазме и темное ядро.

На фоне инъекции АМСККП в вену с тромбозом так же, как и на срок в 4 суток, иногда было отмечено специфическое свечение стенок в мелких сосудах, проходящих между мышечными волокнами, однако признаков тромбоза в таких сосудах уже отмечено не было. Необходимо обратить внимание, что в межфасцикулярных пространствах поперечно-полосатой мышечной ткани, где проходят сосудисто-нервные пучки, присутствует множество кровеносных сосудов с облитерированным просветом, причем облитерация часто была полной. Клетки в тканях на месте этих сосудов имели признаки деструктивных изменений (кариопикноз и кариорексис).

Через **2 недели** после введения АМСККП, параллельно меченных GFP и 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 светились зеленым цветом цитоплазма и оставалось темным ядро, а при применении фильтра DAPI – было отмечено специфическое синее свечение ядра.

Через 2 недели после применения АМСККП рядом с тромбированной веной 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. 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. Просвет сосуда был выполнен гетерогенными массами с большими отверстиями и перетяжками между ними, скорее всего, остатками частично лизированного тромба.

При введении АМСККП непосредственно в тромбированную вену в качестве единичных наблюдений в области сосудистого пучка или места хирургического вмешательства были найдены сосуды с очень яркими светящимися структурами. Эти сосуды были расположены поодиночке, по два, или небольшими группами. Часто в таких светящихся объектах в сосудистой стенке было четко видно темное ядро и ярко светящаяся цитоплазма. Аналогично предыдущему сроку в массиве мышц бедра были найдены сосуды венозного типа с ярким свечением в стенке. Следует отметить, что число таких сосудов со специфическим свечением значительно возросло, они встречались практически у каждого животного и неоднократно. Можно отметить цепочки из таких светящихся сосудов. Иногда в таких мелких сосудах присутствовали остаточные явления тромбоза, и если в ряде случаев свечение в их стенке было гомогенным, то при внимательном изучении видны более темные клеточные ядра и ярко светящаяся цитоплазма клеток, причем не только в эндотелии, но и в других оболочках. Разумеется, не все сосуды были построены с участием светящихся клеток, во всех наблюдениях большинство сосудов, проходящих в мышцах бедра, свечения в структурах их стенок не имели.

Необходимо обратить внимание, что на этот срок в контроле (тромбоз без введения АМСККП) в мышечной ткани присутствовали тромбы в просвете

мелких сосудов, стенка которых была склеротически изменена. Признаков лизиса или реканализации тромбов в этой группе животных через 1 неделю после операции обнаружено не было.

На срок в **3, 4 и 5 недель** после введения АМСККП около нормального сосуда во всех тканях не было найдено специфически светящихся объектов.

При паравазальном использовании АМСККП на фоне тромбоза основное место как в околососудистой 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. В таких сосудах можно было проследить на фоне ярко светящейся клеточной цитоплазмы темное ядро.

На данные точки эксперимента после введения АМСККП в тромбированную вену у всех животных специфическое свечение отсутствовало, как в стенке пораженной вены и паравазальной клетчатке, так и в сосудах рубца на месте хирургического вмешательства.

В литературе имеется множество данных, что введение в поврежденные ткани недифференцированных стволовых клеток сопровождается ангиогенезом. Методами световой микроскопии изучали результаты введения АМСККП в рубцовую ткань крыс и человека. Было найдено формирование групп кровеносных сосудов после использования АМСККП. Сделано заключение, что после введения в рубец АМСККП они формируют кровеносные сосуды за счет дифференцировки в эндотелиоциты и перициты (Майбородин И.В. и др., 2010а, 2010б, 2011г; Maiborodin I., 2011).

Настоящее исследование было предпринято в связи с данными, которые продемонстрировали возможность применения клеточных технологий для ускорения разрешения сосудистых тромбозов (Modarai B. et al., 2005, 2008; Li X.Q. et al., 2007; Tong Z. et al., 2008; Gu Y. et al., 2009; Meng Q.Y. et al., 2010).

Однако, согласно нашим результатам, уже через 4 суток после тромбирования вены без и после введения АМСККП, непосредственно в самой вене сохранялись только остатки тромба, большая часть просвета такого сосуда была свободна. То есть в данном случае восстановление кровотока в тромбированной магистральной вене 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 цитоплазмой при использовании фильтра Alexa 488 и светящимся синим цветом ядом при применении фильтра DAPI.

На этот же срок при введении АМСККП в тромбированную вену в послеоперационных грануляциях присутствовали небольшие группы сосудов капиллярного типа, стенки которых состояли из клеток со светящейся цитоплазмой и темным ядром. 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 (Arpornmaeklong P. et al., 2009; Tasso R. et al., 2010; Stephan S.J. et al., 2010). Видимо, АМСККП, после попадания в тромбированную вену, выходят в ткани через инъекционное отверстие вследствие высокого давления в такой вене, обусловленного самой инъекцией на фоне препятствия кровотоку. Попад в ткани, АМСККП принимают участие в формировании сосудов грануляций.

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 неоангиогенеза с привлечением клеток-предшественников из костного мозга (Shi Q., et al. 1994, 1998; Carmeliet P., Lutton A., 2001). При введении АМСККП, они сразу начинают встраиваться в растущие сосуды и формировать новые в результате дифференцировки в эндотелиоциты и перициты (Creazzo T.L. et al., 1998; Ribatti D. et al, 2002; Cho H., et al., 2003; Carmeliet P., 2004).

Патогенез тромбирования мелких сосудов, проходящих в мышечной ткани бедра, что было найдено через 4 суток 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 магистрали и нарушения оттока) на его ветви, осуществляющие сбор крови от тканей. В результате этого происходит тромбирование не только магистральной вены, но и ее более мелких ветвей.

Далее в магистральной вене тромб лизируется, а в мелких сосудах

фибрин организуется, постепенно поглощается фагоцитами (Майбородин И.В. и др., 2007, 2008, 2009), 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, наиболее вероятно, свидетельствует о восстановлении структур сосудистой стенки и роста эндотелия по отверстиям в тромбе с участием АМСККП.

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

Учитывая появление все большего числа сосудов венозного типа с ярким свечением в стенке в массиве бедренных мышц к сроку в 2 недели после тромбоза и внутривенного введения АМСККП, можно заключить, что восстановление кровотока в регионе тромбированной вены, в мелких ее ветвях, видимо, также тромбированных, максимально на данный срок.

К 3 неделе, по-видимому, ангиогенез в поврежденных тканях был практически закончен, и с этой точки наблюдения у всех животных количество объектов со специфическим свечением прогрессивно уменьшалось, как в паравазальной клетчатке, так и в сосудах рубца на месте хирургического вмешательства. Расположенные в мышечной ткани бедра сосуды уже не содержали в стенке светящихся объектов.

Не всегда постепенное исчезновение свечения в стенке сосудов 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 (Майбородин И.В. и др., 2010а, 2010б, 2011г; Maiborodin I., 2011). Тем более, что введенные АМСККП содержали в геноме чужеродную ДНК, кодирующую синтез GFP.

Оценка процессов восстановления кровотока в регионе тромбированной вены на основании морфометрии. При венозном тромбозе без введения АМСККП в месте хирургического вмешательства относительная площадь мелких и средних сосудов на срезе на 1, 2, 3, 4 и 5 неделях была статистически достоверно больше на 40,6 %, 78,2 %, в 2,7, 3 и 2,2 раза, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. При этом величина значения данного показателя на 1 неделе была ниже на 26,8 %, 93,7 %, в 2,2 раза и на 54,9 %, соответственно, по сравнению со сроками в 2, 3, 4 и 5 недель. Через 2 недели сосудов было меньше на 52,8 %, 71,1 % и 22,2 %, соответственно, чем спустя 3, 4 и 5 недель. К 3 неделе площадь сосудов была статистически достоверно выше на 12 %, относительно 4 недели, но ниже на 25 %, чем через 5 недель. На 4 неделе сосудов было больше на 40 %, по сравнению с 5 недель.

После введения АМСККП в нормальную вену площадь сосудов на участке операции только на 1 неделе была больше на 33,7 %, относительно состояния у интактных крыс. Данный показатель на 1 неделе был выше на 20,5 %, 22,7 %, 36,5 % и 44,4 %, соответственно, по сравнению со сроками в 2, 3, 4 и 5 недель.

Относительная площадь мелких и средних сосудов на срезе в месте хирургического вмешательства после инъекции АМСККП возле нормальной вены на 1, 2 и 3 неделях было достоверно больше на 31,7 %, 45,5 % и в 2,1 раза, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. Величина значения этого показателя на 1 неделе была ниже на 60,2 %, по сравнению со сроком на 3 неделе, но больше на 27,9 %, относительно состояния на 4 неделе. Через 2 недели сосудов было меньше на 44,9 %, чем спустя 3 недели, но больше на 41,3 %, по сравнению с 4 неделями. К 3 неделе площадь сосудов была выше в 2 раз~~а~~, относительно состояния на 4 неделе.

После введения АМСККП в тромбированную вену относительная

площадь мелких и средних сосудов на срезе в месте хирургического вмешательства на 1, 2, 3, 4 и 5 неделях было больше на 52,9 %, 98 %, в 2,9, 2,9 раза и на 89,1 %, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. Величина значения этого показателя на 1 неделе была ниже на 30,7 %, 91,5 %, 92,2 % и 24,8 %, соответственно, по сравнению со сроками в 2, 3, 4 и 5 недель. Через 2 недели сосудов было меньше на 46,5 % и 47 %, соответственно, чем спустя 3 и 4 недели. На 3 и 4 неделях площадь сосудов была выше на 53,4 % и 53,9 %, также соответственно, относительно состояния на 5 неделе.

Площадь сосудов на участке операции после инъекции АМСККП возле тромбированной вены на 1, 2, 3, 4 и 5 неделях была больше на 83,2 %, в 3, 2,8, 2,2 раза и на 78,2 %, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. На фоне этого величина данного показателя на 1 неделе была ниже на 64,9 %, 54,6 % и 21,6 %, соответственно, по сравнению со сроками в 2, 3 и 4 недели. Через 2 недели сосудов было больше на 35,6 % и 69,4 %, соответственно, чем спустя 4 и 5 недель. К 3 неделе площадь сосудов оставалась выше на 27,1 % и 58,9 %, также соответственно, относительно состояния на 4 и 5 неделях. На 4 неделе сосудов было больше на 25 %, по сравнению с 5 неделей.

Таким образом, можно заключить, что введенные в ткани АМСККП вызывают увеличение относительной площади сосудов на срезе, и это более выражено в случае наличия в регионе тромбированного сосуда.

При венозном тромбозе без введения для коррекции АМСККП относительная площадь сосудов на срезе постепенно нарастает до 4 недели, затем начинается постепенное снижение. Это также, наиболее вероятно связано с формированием и инволюцией грануляций.

При инъекции АМСККП в нормальную вену на фоне однократной операции, введенные АМСККП распределяются током крови по всему организму, относительная плотность сосудов в месте операции максимальна уже на 1 сутки, а далее уже не отличается от исходной. Видимо, это связано с малым объемом грануляций и быстрой их инволюцией.

После введения АМСККП рядом с нормальной веной площадь сосудов нарастает до 3 недели и только потом начинает снижаться. Скорее всего, такое длительное существование грануляций обусловлено присутствием АМСККП в тканях.

После введения АМСККП в тромбированную вену и паравазально от нее площадь сосудов максимальна уже на 2 неделе после операции и остается

практически на том же уровне до 4 недели, но даже спустя 5 недель эти показатели остаются выше исходного. Скорее всего, введенные АМСККП участвуют в развитии грануляций в области магистральных сосудов, где ткани повреждены как в результате манипуляций с веней при моделировании тромбоза, так и после травмы инъекционной иглой и введения под давлением суспензии АМСККП в культуральной среде. Более быстрое и массивное развитие грануляций, в свою очередь, может способствовать ускоренному очищению послеоперационной раны от детрита и быстрому заживлению ее.

В нормальных условиях при повреждении тканей и развитии грануляций, сосуды в них растут как за счет уже имеющихся в регионе сосудов, так и вследствие неоангиогенеза из собственных стволовых клеток. Введение АМСККП паравазально (при внутривенном применении на фоне тромбированной вены возможно вытекание вводимой под давлением суспензии АМСККП из инъекционного отверстия в окружающие ткани) способствует попаданию в ткани стволовых клеток извне намного быстрее, чем своих собственных.

Введенные АМСККП сразу начинают участвовать в формировании сосудов, видимо, из-за присутствия среди них клеток, уже стимулированных к дифференцировке в направлении эндотелиоцитов и перицитов. Также следует учитывать возможность стимуляции дифференцировки введенных АМСККП в этом направлении в результате тканевой гипоксии (Martin-Rendon E. et al., 2007; Hu X. et al., 2008), вызванной сосудистым тромбозом и нарушениями оттока крови (Горшков С.З., Караванов Г.Г., 1972; Савельев В.С., 2001; Горшков С.З., Мусалатов Х.А., 2003).

При венозном тромбозе без введения АМСККП в месте хирургического вмешательства количество мелких и средних сосудов на 10^5 мкм² площади среза на 1, 2, 3, 4 и 5 неделях было статистически достоверно больше на 82,9 %, в 2,2, 2,4, 3 и 2 раза, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. При этом величина значения данного показателя на 1 неделе была ниже на 31,8 % и 61,7 %, соответственно, по сравнению со сроками в 3 и 4 недели. К 4 неделе число сосудов было выше на 33,9 %, 22,7 % и 46,5 %, соответственно, относительно состояния на 2, 3 и 5 неделе.

После введения АМСККП в нормальную вену численность сосудов на единицу площади среза тканей на участке операции только на 1 и 2 неделях была больше на 66,3 % и 67,5 %, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. Данный показатель на 1 неделе был выше на 41,1 %, 53,7 % и 64,9 %, соответственно, по сравнению со сроками в 3, 4 и 5 недель. При этом

величина значения данного показателя на 2 неделе была больше на 42,1 %, 54,8 % и 66,1 %, соответственно, относительно состояния на 3, 4 и 5 неделе.

Количество мелких и средних сосудов на 10^5 мкм² на срезе в месте хирургического вмешательства после инъекции АМСККП возле нормальной вены на 1, 2 и 3 неделях было достоверно больше на 78,1 %, в 2,1 и 2,1 раза, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. Величина значения данного показателя на 4 неделе была ниже на 70,1 %, в 2 раза и на 96,1 %, соответственно, по сравнению со сроками в 1, 2 и 3 недели. Через 5 недель сосудов стало меньше на 87,7 %, в 2,2 и 2,2 раза, соответственно, относительно состояния на 1, 2 и 3 неделе.

После введения АМСККП в тромбированную вену численность мелких и средних сосудов на единицу площади срезанной ткани в месте хирургического вмешательства на 1, 2, 3, 4 и 5 неделях была больше в 2, 2,5, 2,4, 2,1 раза и на 53,2 %, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. На 2-й и 3-й неделях содержание сосудов было выше на 60,5 % и 59,7 %, также соответственно, относительно состояния на 5 неделе.

Количество сосудов на 10^5 мкм² площади срезанной ткани на участке операции после инъекции АМСККП возле тромбированной вены на 1, 2, 3, 4 и 5 неделях было больше в 2,5, 3, 3,1, 3 раза и на 92,4 %, соответственно, относительно состояния у интактных крыс. На фоне этого величина данного показателя на 1 неделе была ниже на 22,7 %, 24,2 % и 22,2 %, соответственно, по сравнению со сроками в 2, 3 и 4 недели. Через 5 недель сосудов стало меньше на 56,8 %, 58,6 % и 56,2 %, соответственно, чем спустя 2, 3 и 4 недели.

Численная плотность мелких и средних сосудов на срезе при венозном тромбозе без введения АМСККП постепенно нарастает до 4 недели, затем начинает снижаться. При введении АМСККП в нормальную вену величина значения этого показателя максимальна уже на 1 неделе, затем уменьшается и с 3 недели статистически достоверно не отличается от интактного контроля. После инъекций АМСККП рядом с нормальной веной число сосудов нарастает до 2 недели, а к 4 недели возвращается на исходный уровень. В результате введения АМСККП в тромбированную вену или паравазально от нее количество сосудов максимально уже на 2 неделе, остается высоким до 3-4 недели и только потом начинает уменьшаться. Следует отметить, что этот показатель во всех группах животных с венозным тромбозом, как без коррекции, так и после введения АМСККП, выше исходных данных на все сроки эксперимента.

Скорее всего, более выраженные изменения численности сосудов в

группах животных с венозным тромбозом, относительно крыс с введением АМСККП в нормальную вену или рядом с ней, обусловлены двукратной операцией при моделировании указанной патологии. При двойном хирургическом вмешательстве объем поврежденных тканей больше и, соответственно, больше объем грануляций и число сосудов в них. Видимо, не все сосуды грануляций успевают подвергнуться инволюции к окончанию времени наблюдения – к 5 неделе.

После введения АМСККП в нормальную вену численность сосудов нормализуется значительно быстрее, чем после инъекций АМСККП рядом с такой веной. Наиболее вероятно, что при внутривенной инъекции АМСККП, они распространяются с током крови по всему организму и не оказывают никакого влияния на ткани рядом с веной и в месте операции. При паравазальной инъекции АМСККП формируют кровеносные сосуды (Майбородин И.В. и др., 2010а, 2010б, 2011г; Maiborodin I., 2011) в тканях, за счет чего и там и там возрастает численность данных объектов. Постепенно, возможно, что в процессе инволюции грануляций, содержание сосудов возвращается к исходному уровню.

По-видимому, также в результате действия АМСККП в направлении ангиогенеза более быстро и более выражено нарастает численность сосудов в группах животных после введения АМСККП в тромбированную вену или рядом с ней, по сравнению с результатами при венозном тромбозе без применения клеточных технологий.

Возможно, что в группах крыс после введения АМСККП в тромбированную вену или рядом с ней в результате применения АМСККП более быстро развиваются грануляции, свидетельством чего и является возрастание численной плотности сосудов. В результате быстрого и массивного роста грануляций более быстро происходит очищение раны от детрита, нежизнеспособных тканей и антигенных веществ.

ВЫВОДЫ

1. При экспериментальном тромбозе вместе с формированием тромба в магистральной вене также тромбируются ее мелкие ветви, находящиеся в тканях, за счет ретроградного движения тромбина при повышении давления во время его инъекции. В тромбированных мелких ветвях пораженной магистральной вены восстановление кровотока происходит или через реканализацию тромба или через облитерацию тромбированных сосудов и прорастание новых.

2. АМСККП участвуют в процессе реканализации тромбированных и

прорастании новых ветвей магистральной вены, что приводит к более быстрому восстановлению кровотока в тканевом микрорайоне. Для восстановления микроциркуляции эффективно и паравазальное и внутривенное введение АМСККП. Но инъекция АМСККП непосредственно в тромбированную вену оказывает более выраженное действие вследствие ретроградного распространения клеток по ветвям вены из-за препятствия кровотоку в виде тромба. После внутривенной инъекции АМСККП в тканях найдено значительно больше сосудов с присутствием в стенке введенных АМСККП, чем после введения их паравазально. У крыс восстановление кровотока в тканевом регионе тромбированной вены завершается к 3 неделе после моделирования тромбоза и введения АМСККП в просвет такого сосуда.

3. При введении АМСККП в паравазальную клетчатку они принимают участие в развитии грануляций в месте хирургического вмешательства.

4. АМСККП после инъекции в тромбированную вену или рядом с ней не мигрируют и не разрушаются в месте введения, а формируют кровеносные сосуды тканей и грануляций за счет дифференцировки в структуры их стенок. Через 3 недели после введения АМСККП начинает уменьшаться количество сосудов со светящимися объектами в их стенках, также снижается интенсивность свечения. К 4-й неделе только в единичных наблюдениях присутствуют сосуды со светящимися объектами в стенке, а спустя 5 недель нет сосудов со светящимися объектами в стенке как в паравазальной клетчатке, так и в месте хирургического вмешательства. Постепенно введенные АМСККП и структуры, сформированные с их участием, вытесняются собственными клетками организма-реципиента.

5. При моделировании венозного тромбоза без последующей коррекции показатели площади и числа сосудов на срезе тканей увеличены до 4 недели после введения тромбина. После введения АМСККП рядом с нормальной веной повышенная площадь сосудов сохраняется и на 5 неделе, что, скорее всего, обусловлено действием введенных в ткани АМСККП, которые способствуют как более быстрому развитию грануляций, так и большему числу сосудов в них. На фоне инъекций АМСККП в тромбированную вену или паравазально от нее васкуляризация максимальна уже на 2 неделе после операции и остается практически на том же уровне до 4 недели, но даже спустя 5 недель этот показатель выше исходного.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В связи с тем, что после использования АМСККП быстрее восстанавливается кровоток в тканевом микрорайоне тромбированной вены, о

чем свидетельствует участие АМСККП в реканализации тромбов и большое число молодых сосудов с присутствием в стенке инъецированных АМСККП, целесообразно введение АМСККП непосредственно в тромбированную вену при коррекции тромботических состояний.

2. В нормальных условиях при повреждении тканей и развитии грануляций сосуды в них растут как за счет уже имеющихся в регионе сосудов, так и вследствие неоангиогенеза из собственных стромальных клеток. Введение АМСККП способствует попаданию в ткани стволовых клеток извне намного быстрее, чем своих собственных. В результате применения АМСККП раньше и более быстро развиваются грануляции в месте хирургического вмешательства, что может способствовать более быстрому очищению раны от детрита, нежизнеспособных тканей и антигенных веществ, раннему развитию репарационных процессов и быстрому заживлению тканей в месте хирургического вмешательства. Со временем введенные АМСККП и структуры, сформированные с их участием, вытесняются собственными клетками организма-реципиента. Является показанным введение собственных стволовых клеток при лечении больных в хирургической и травматологической практике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кузнецова И.В., Шевела А.И., Морозов В.В., Новикова Я.В., **Марчуков С.В.**, Севостьянова К.С., Майбородин И.В. Экспериментальные модели венозного тромбоза и возможность применения клеточных технологий для коррекции тромботических состояний // **Флебология.** – 2012. – Т. 6, № 1. – С. 43-47, автора – п.л.

2. Майбородин И.В., Морозов В.В., Новикова Я.В., Матвеева В.А., Артемьева Л.В., Матвеев А.Л., Хоменюк С.В., **Марчуков С.В.** Морфологические результаты введения стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения в тромбированную вену в эксперименте. // **Морфология.** – 2012. – Т. 142, № 4. – С. 54-61, автора – п.л.

3. Майбородин И.В., Морозов В.В., Новикова Я.В., Матвеева В.А., Артемьева Л.В., Матвеев А.Л., Хоменюк С.В., **Марчуков С.В.** Стимуляция ангиогенеза в тканях крыс после введения мезенхимальных стволовых клеток рядом с тромбированной веной. // **Патология кровообращения и кардиохирургия.** – 2012. – № 2. – С. 81-86, автора – п.л.

4. Майбородин И.В., Шевела А.И., Матвеева В.А., **Марчуков С.В.**, Баранник М.И., Дровосеков М.Н., Колесников И.С. Регенерация поврежденной кости нижней челюсти крыс после введения аутологических мезенхимальных

стволовых клеток костномозгового происхождения. // Регенеративная биология и медицина : сб. науч. тр. Всеросс. конф.: – М.: Издательский дом «Нарконет», 2011. – С. 104-105, автора – п.л.

5. **Марчуков С.В.** Возможность использования клеточных технологий в коррекции тромботических состояний. // Регенеративная биология и медицина : сб. науч. тр. Всеросс. конф.: – М.: Издательский дом «Нарконет», 2011. – С. 106-107, автора – п.л.

6. Майбородин И.В., Шевела А.И., Морозов В.В., Новикова Я.В., Матвеева В.А., Дровосеков М.Н., Баранник М.И., **Марчуков С.В.**, Кузнецова И.В., Севостьянова К.С. Ангиогенез у крыс после введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в участок хронического воспаления. // Фундаментальные и прикладные аспекты воспаления : мат. международ. науч. конф. – Минск : Экономпресс, 2011. – С. 156-159, автора – п.л.

7. **Марчуков С.В.**, Якимова Н.В. Морфологические результаты применения стволовых клеток на фоне венозного тромбоза в эксперименте. // Санкт-Петербургские научные чтения – 2011 : тез. IV Международ. молодежного мед. конгр. – С-Пб., 2011. – С. 258, автора – п.л.

Автор искренне благодарен научным руководителям д.м.н., профессору И.В. Майбородину и д.м.н., профессору В.В. Морозову за научно-методическую помощь, ценные замечания и консультации в ходе выполнения работы.

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»).