

© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.14-005.6-08:599.323.4

*И. В. Майбородин, В. В. Морозов, Я. В. Новикова, В. А. Матвеева,
Л. В. Артемьева, А. Л. Матвеев, С. В. Хоменюк и С. В. Марчуков*

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ВВЕДЕНИЯ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОМЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ТРОМБИРОВАННУЮ ВЕНУ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А. И. Шевела), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Методами люминесцентной микроскопии на 226 крысах-самцах линии Wag изучали результаты введения мультипотентных аутологичных стромальных (мезенхимальных) стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП) с геном GFP в тромбированную вену задней конечности. Обнаружено, что восстановление кровотока в тромбированной магистральной вене всегда идет за счет тромболизиса. Признаков встраивания введенных АССККП в стенку тромбированного сосуда, реканализации тромба и формирования коллатералей не обнаружено. При моделировании тромбоза в эксперименте введением тромбина и лигированием магистральной вены происходит и тромбирование ее мелких ветвей, где восстановление кровотока происходит или через реканализацию тромба, или после облитерации тромбированных сосудов путем прорастания новых. АССККП участвуют в обоих этих процессах, что приводит к более быстрому восстановлению кровотока в тканевом микрорайоне тромбированной вены. Постепенно введенные АССККП и структуры, сформированные с их участием, вытесняются собственными клетками организма-реципиента.

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

Профилактика и лечение сосудистых тромбозов является одной из острейших и наиболее значимых проблем современной медицины во всем мире. Около 30% пациентов, перенесших тромбоз, погибают в ближайший месяц, а еще у 20% в течение 3 мес развивается рецидив заболевания [4]. Реваскуляризация пораженных вследствие сосудистого тромбоза тканей проходит двумя основными путями: развитием коллатерального кровотока и реканализацией самого тромба. Оба эти процесса протекают в течение времени, очень часто, в случае поражения магистральных сосудов, достаточного для некротизирования лишенных кровоснабжения тканей и даже органов и конечностей.

Показано, что костномозговые клетки-предшественники (плюрипотентные и конкретные линии стволовых клеток) участвуют в естественном разрешении тромбоза [6, 7, 10, 12, 13, 16]. Реканализация тромба и восстановление кровотока в ишемизированных в результате тромбоза тканях были достигнуты в эксперименталь-

ных моделях с проангиогенными агентами [5, 7, 11, 14–16].

В литературе имеются только косвенные данные о возможности применения стволовых клеток для реканализации тромба или ускоренного роста коллатералей в ишемизированных тканях, но отсутствуют результаты исследований, доказывающие рост сосудов в тканевом регионе тромбоза после введения мультипотентных стволовых клеток.

Цель настоящей работы — исследование возможности восстановления нарушенного кровотока в тканях путем применения мультипотентных аутологичных стромальных (мезенхимальных) стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП). Клетки считали аутологичными, поскольку они получены от линейных животных, генетически идентичных реципиентам.

Материал и методы. Исследование проведено на самцах крыс линии Wag массой 180–200 г в возрасте 6 мес (n=226) с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», все манипуляции

Сведения об авторах:

Майбородин Игорь Валентинович (e-mail: imai@mail.ru), Морозов Виталий Валерьевич, Матвеева Вера Александровна, Артемьева Людмила Владимировна, Марчуков Сергей Вадимович, лаборатория стволовой клетки; Новикова Яна Владимировна, Хоменюк Сергей Владимирович, лаборатория инвазивных медицинских технологий; Матвеев Андрей Леонидович, лаборатория молекулярной микробиологии, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Центр новых медицинских технологий, 630090 Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом.

АССККП 2-го пассажа, полученные от крысы указанной линии, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., США), содержащей ген зеленого флюоресцентного 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., США). Трансфекцию проводили в присутствии реагента для трансфекции TurboFect (Fermentas life sciences, Inc, Канада) 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 ч после трансфекции клетки разводили нетрансфицированными клетками в соотношении 1:2,5 соответственно и использовали для введения экспериментальным животным. Оставшиеся после трансплантации клетки поддерживали в культуре в течение 1 мес для оценки эффективности трансфекции и стабильности экспрессии введенного гена.

Экспрессию введенного гена GFP АССККП оценивали визуально под флюоресцентным микроскопом, непосредственно просматривая культуру или используя камеру Горяева для подсчета трансфицированных клеток через 48 ч после трансфекции. Эффективность последней оценивали как долю светящихся клеток от всех клеток в камере Горяева. Доля трансфицированных клеток в разбавленной культуре составляла около 3%.

Как и в большинстве случаев при использовании технологии, основанной на введении плазмидной ДНК, наблюдали только временную экспрессию введенного GFP в АССККП крысы. Культивирование клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1 без селекции (не использовали дженетицин — G418, Sigma, США) показало снижение количества клеток, синтезирующих зеленый флюоресцентный белок, вследствие их вытеснения нетрансфицированными клетками. Даже спустя 1 нед в культуре трансфицированных клеток 1-го пассажа, высеченных из плотности 5000 клеток на 1 см^2 , наблюдали клетки, синтезирующие зеленый флюоресцентный белок.

Описано множество экспериментальных моделей венозного тромбоза. Однако, мы пользовались самым простым, воспроизводимым и наименее травматичным методом S. Wessler и соавт. [17]. 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 сут осуществляли повторный доступ к тромбированной вене, и после удаления лигатуры вводили 50 мкл суспензии АССККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл) непосредственно в тромбированную вену, что приводит к их быстрому попаданию в ткани с гипоксией и в очень большом количестве. В качестве контроля использовали интактных крыс, животных

с венозным тромбозом без использования АССККП и с внутривенным применением АССККП без предварительного тромбирования вены. Животных всех групп выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 4 сут, 1, 2, 3, 4 и 5 нед после введения АССККП. На каждую временную точку приходилось по 11–12 животных.

V. femoralis с окружающими тканями фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 ч, обезживали в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Неокрашенные срезы толщиной 5–7 мкм изучали с помощью светового микроскопа Axioimager M1 (Zeiss, Германия) при увеличении до 1500 раз в режиме люминесценции с фильтром Alexa 488. Параллельно в режиме проходящего света видимого диапазона изучали срезы, окрашенные гематоксилином — эозином.

Результаты исследования. При исследовании методом люминесцентной микроскопии у интактных животных, при тромбозе без последующего введения АССККП и после внутривенной инъекции АССККП без предварительного моделирования тромбоза во все сроки наблюдения специфическое свечение отсутствовало в стенке магистральных сосудов и в паравазальной соединительной ткани (рис. 1, а), в тканях вдали от сосудистого пучка (см. рис. 1, б) и в сосудах, проходящих в мышцах бедра.

Через 4 сут после введения АССККП в тромбированную вену непосредственно в самой вене сохранялись только остатки тромба, большая часть ее просвета была свободна (рис. 2, а, б).

Специфического свечения не было обнаружено ни в самом тромбе, ни в стенке вены и в непосредственной близости от нее. Вместе с этим, крайне редко в послеоперационных грануляциях присутствовали небольшие группы сосудов капиллярного типа, стенки которых состояли из клеток со светящейся цитоплазмой и темным ядром (см. рис. 1, в).

При примененном моделировании тромбоза, когда тромб в крупной вене уже почти был лизирован (см. рис. 2, а, б), наблюдались тромбы в мелких ветвях этого сосуда, проходящих в толще мышц бедра (см. рис. 1, г). Проходимость этих сосудов к 4-м суткам еще не была восстановлена (см. рис. 1, г). В их просвете, в паравазальной соединительной ткани и между сосудами были обнаружены единичные, небольшие, часто овальные, специфически светящиеся объекты (см. рис. 1, г), возможно, сосуды, прорастающие через тромб в просвете сосуда (реканализация тромба), и сосуды, формирующиеся рядом с тромбированными для осуществления коллатерального кровотока.

Через 1 нед после инъекции АССККП сосуды и их группы со специфическим свечением в непосредственной близости от тромбированной вены

обнаружены не были. Также отсутствовали светящиеся структуры в стенке и внутри нее. В вене имелись фрагменты пристеночного тромба, но специфического свечения в нем не было.

Через 4 сут иногда было отмечено специфическое свечение стенок мелких сосудов, проходящих между мышечными волокнами, однако признаков тромбоза в них не обнаружено (см. рис. 1, д, е).

В поперечнополосатой мышечной ткани, в соединительнотканых прослойках, где проходят сосудисто-нервные пучки, присутствовало множество кровеносных сосудов часто с полностью облитерированным просветом (рис. 2, в). Тип, таким образом измененных сосудов, определить было невозможно. Клетки в тканях на месте этих сосудов имели признаки деструктивных изменений (кариопикноз и кариорексис) (см. рис. 2, в). В мышечной ткани были обнаружены также варикозно-измененные сосуды (см. рис. 1, е; 2, г).

Через 2 нед после введения АССККП в тромбированную вену в большинстве наблюдений сосуды со специфическим свечением в непосредственной близости от тромбированной вены обнаружены не были. Также отсутствовали светящиеся структуры в стенке и внутри последней.

Однако довольно редко в области сосудистого пучка или в месте хирургического вмешательства были найдены сосуды с очень яркими светящимися структурами (см. рис. 1, ж). Эти сосуды были расположены поодиночке, по 2 или небольшими группами (см. рис. 1, ж). Часто в стенке таких светящихся сосудов видны клетки с темным ядром и ярко светящейся цитоплазмой (см. рис. 1, ж).

Как и в предыдущий срок в мышцах бедра были обнаружены сосуды венозного типа с ярким свечением стенки. Число таких сосудов со специфическим свечением значительно возросло, они встречались практически у каждого

животного и неоднократно (см. рис. 1, з). Можно отметить цепочки из таких светящихся сосудов, по-видимому, обусловленные их варикозностью и извитостью (см. рис. 1, з).

В таких сосудах капиллярного типа присутствовали остаточные явления тромбоза, и если в ряде случаев свечение в их стенке было гомогенным, то иногда были видны более темные ядра и ярко светящаяся цитоплазма не только эндотелиоцитов, но и клеток наружного слоя.

Во всех наблюдениях большинство сосудов, проходящих в мышцах бедра, свечения в структурах их стенок не имели.

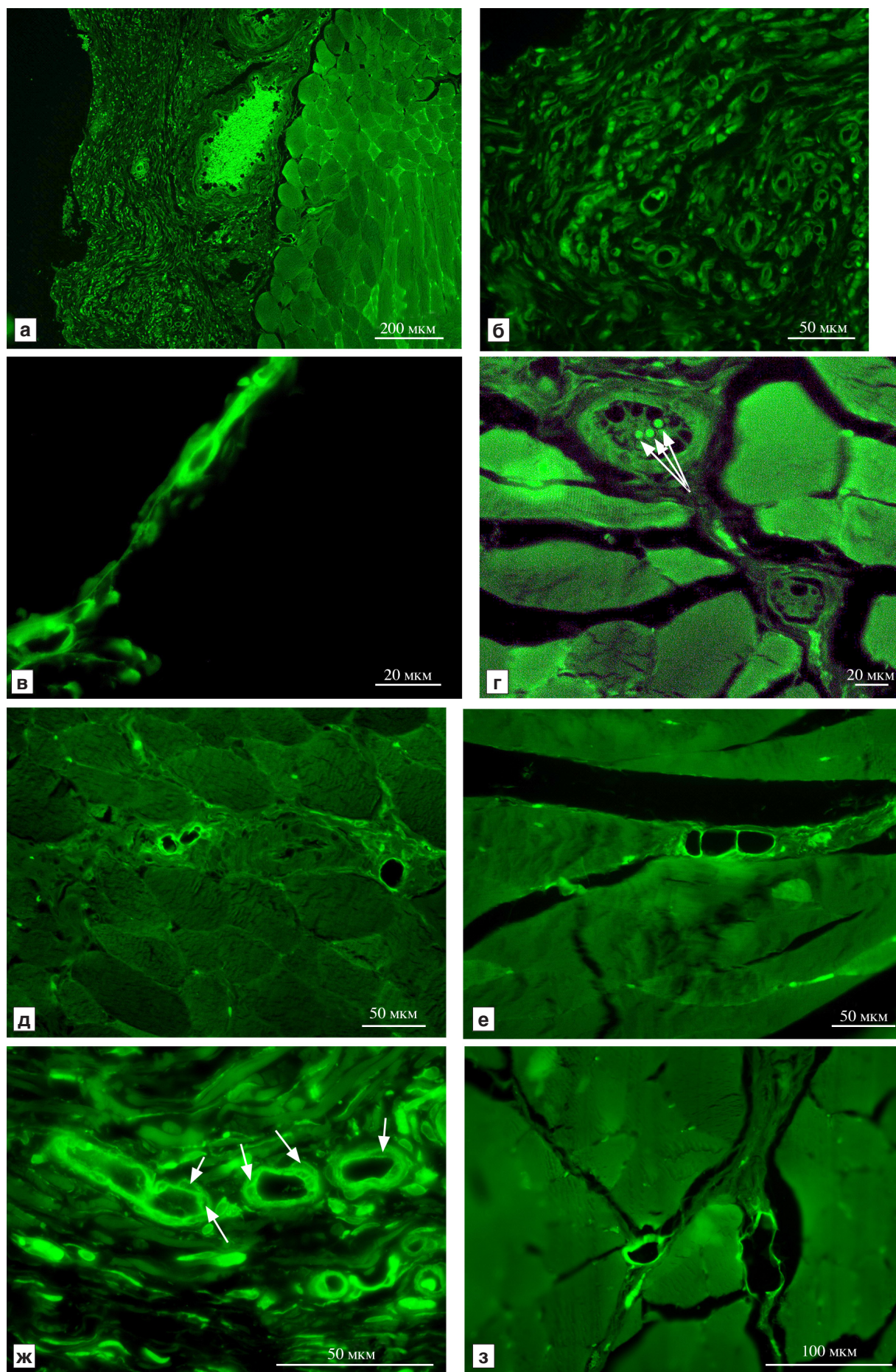
В этот срок в контроле (тромбоз без введения АССККП) в мышечной ткани присутствовали тромбированные мелкие сосуды, стенка которых была склеротически изменена (см. рис. 2, д, е). В одном наблюдении на серийных срезах в просвете сосуда удалось проследить не только хвост тромба, но и то место, где тромб прикреплен к сосудистой стенке (место повреждения эндотелия) (см. рис. 2, д, е). Признаков лизиса или реканализации тромбов в этой группе животных через 1 нед после операции обнаружено не было (см. рис. 2, д, е).

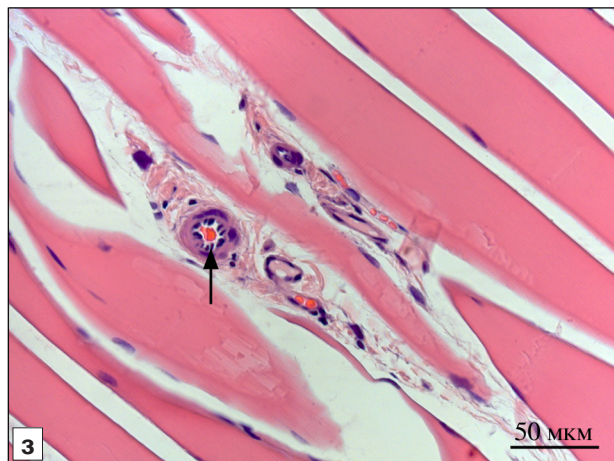
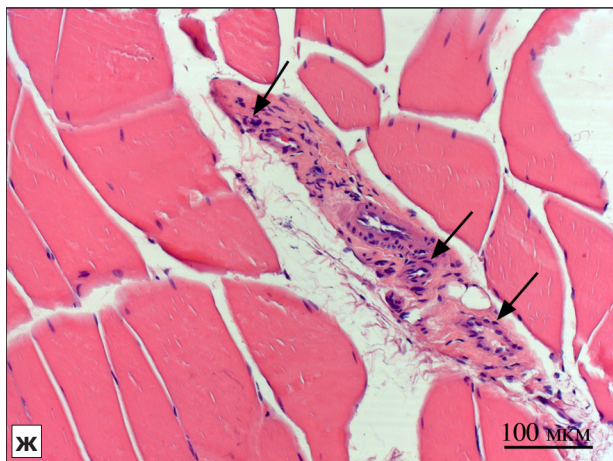
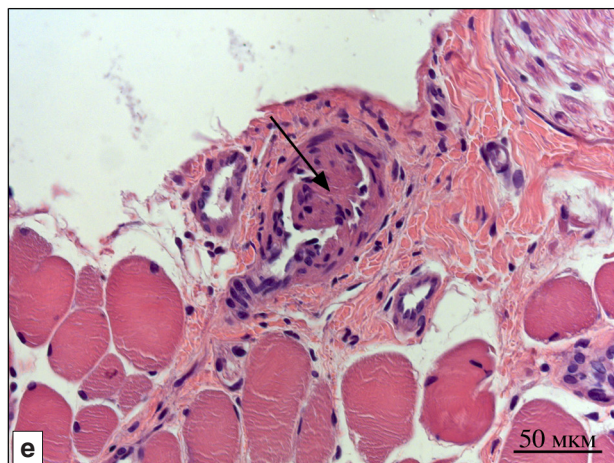
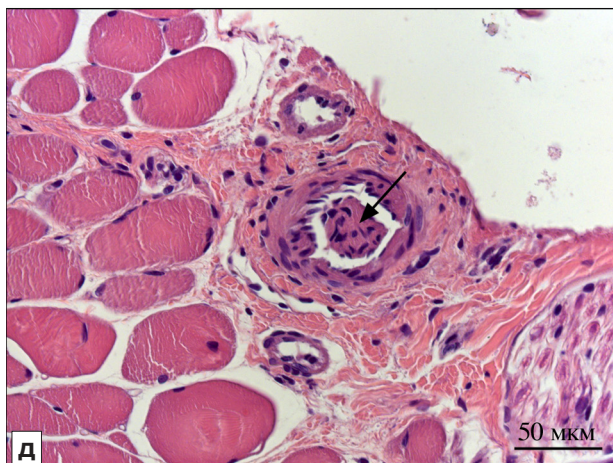
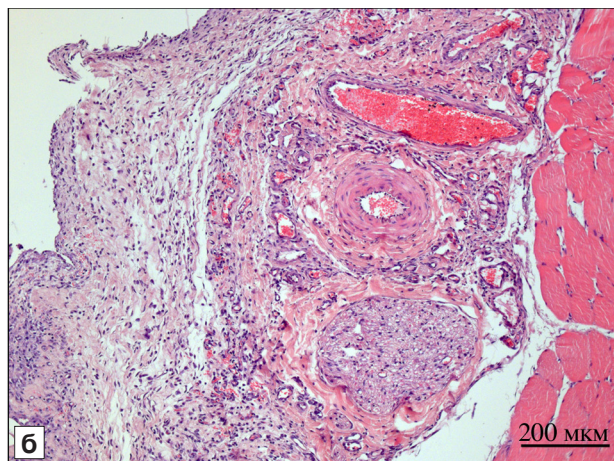
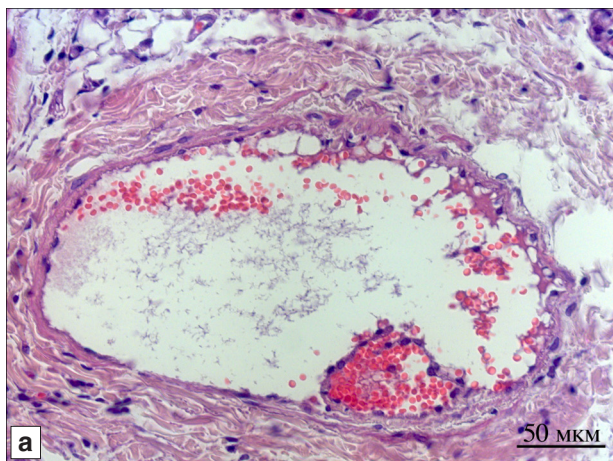
Через 3 нед после введения АССККП в тромбированный сосуд практически во всех наблюдениях и у всех животных специфическое свечение отсутствовало, как в его стенке и паравазальной соединительной ткани, так и в сосудах рубца на месте хирургического вмешательства.

В мышцах бедра также отсутствовали сосуды со специфическим свечением в стенке, но они имели признаки варикозных изменений: очень широкий растянутый просвет и на гистологическом срезе были представлены в виде цепочки (срез через извитой сосуд). В этих сосудах остаточных признаков тромбоза уже не было.

Рис. 1. Ангиогенез после моделирования венозного тромбоза у крысы и введения мультипотентных аутологичных стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП) в тромбированную вену и без него.

а — через 2 нед после моделирования венозного тромбоза без последующего введения АССККП в стенке вены и в сосудах окружающей клетчатки специфически светящиеся объекты отсутствуют; б — спустя 2 нед после тромбирования вены без применения АССККП в сосудах на месте хирургического вмешательства специфически светящихся объектов нет; в — после введения АССККП в тромбированную вену уже на 4-е сутки имеется яркое специфическое свечение в стенке сосудов капиллярного типа, находящихся в грануляциях; г — в просвете тромбированного кровеносного сосуда, в мышечной ткани бедра, через 4 сут после моделирования тромбоза с последующей инъекцией АССККП содержатся ярко светящиеся круглые объекты (стрелки). Находящиеся рядом сосуды также тромбированы, но не имеют светящихся объектов в просвете и структурах стенки; д — через 1 нед после введения АССККП в тромбированную вену имеется свечение стенок сосудов с широким просветом, проходящих в мышечной ткани, признаков тромбоза в них нет; е — специфическое свечение тонких стенок цепочки сосудов в мышцах бедра спустя 1 нед после использования АССККП на фоне венозного тромбоза; ж — на 2-й неделе после инъекции АССККП в тромбированную вену в послеоперационном рубце содержатся группы ярко светящихся сосудов с тонкими стенками и широким просветом. Часто в клетках сосудистой стенки отчетливо видно темное ядро на фоне ярко светящейся цитоплазмы (стрелки); з — в мышцах бедра через 2 нед после введения АССККП в вену при тромбозе видны сосуды и их цепочки с ярко светящимися тонкими стенками. Неокрашенные срезы в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром «Аlexa 488».





Однако в прослойках соединительной ткани по-прежнему присутствовали сосуды с облитерированным просветом, но рядом с такими сосудами были расположены и сосуды с имеющимся просветом, возможно, после реканализации тромба или вновь образованные (см. рис. 2, ж).

Спустя 4 и 5 нед после введения АССККП в тромбированную вену у всех животных специфическое свечение отсутствовало как в стенке пораженной вены и паравазальной соединительной ткани, так и в сосудах рубца на месте хирургического вмешательства. Сосуды, расположенные в мышцах бедра, также не содержали в стенке светящихся объектов, но она была утолщена, и на 4-й неделе после операции наблюдалась складчатость эндотелиальной выстилки некоторых артерий (см. рис. 2, з).

Обсуждение полученных данных. Имеются множество данных, что введение в поврежденные ткани стволовых клеток сопровождается ангиогенезом. При световой микроскопии после введения АССККП в рубцовую ткань крыс и человека было обнаружено формирование групп кровеносных сосудов и сделано заключение, что эти сосуды образуются за счет дифференцировки АССККП в эндотелициты и перипиты [1–3, 8, 9].

Настоящее исследование было предпринято в связи с данными, которые продемонстрировали возможность применения клеточных технологий для ускорения разрешения сосудистых тромбозов [6, 7, 10, 12, 13, 16].

Однако, согласно нашим результатам, уже через 4 сут после тромбирования вены без введения АССККП и после него непосредственно в самой вене сохраняются только остатки тромба, большая часть просвета такого сосуда была свободна, т.е. в данном случае восстановление кровотока в тромбированной магистральной вене всегда идет за счет тромболизиса, приводящего

уже через 4 сут к рассасыванию большей части тромба. Тромболизис осуществляется за счет гуморальных факторов и не требует привлечения как собственных, так и введенных стволовых клеток. Признаки встраивания АССККП в стенку тромбированного сосуда не найдены ни в одном случае во все сроки эксперимента. Признаки реканализации тромба и формирования коллатералей также не обнаружены.

В этот же срок в послеоперационных грануляциях присутствовали небольшие группы сосудов капиллярного типа, стенки которых состояли из клеток со светящейся цитоплазмой и темным ядром. Доказательством того, что эти сосуды были сформированы именно в результате введения АССККП и из них, является свечение цитоплазмы клеток. Ген GFP, введенный в ДНК АССККП, неизменным передается дочерним клеткам и клеткам следующих поколений. Эти клетки и структуры, сформированные из них, точно также светятся в отраженном ультрафиолетовом свете.

Видимо, АССККП после попадания в тромбированную вену выходят в ткани через инъекционное отверстие вследствие высокого давления в такой вене, обусловленного самой инъекцией на фоне препятствия кровотоку. Попадая в ткани, АССККП принимают участие в формировании сосудов грануляций.

Патогенез тромбирования мелких сосудов, проходящих в мышечной ткани бедра, что было обнаружено через 4 сут 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 тромбирование не только магистральной вены, но и ее более мелких ветвей.

Рис. 2. Восстановление кровотока в регионе тромбированной вены после введения мультипотентных аутологичных стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП) и без него.

а — 4 сут после моделирования венозного тромбоза без последующего введения АССККП. Вена практически пустая, присутствуют небольшие фрагменты тромба, к эндотелию примыкает много лейкоцитов; б — 4 сут после введения АССККП в тромбированную вену. Рядом с сосудистым пучком находятся обширные грануляции. В просвете магистральной вены присутствуют только небольшие фрагменты тромба; в — после введения АССККП на фоне венозного тромбоза. Сосуд с полностью облитерированным просветом (стрелка) в толще мышечной ткани бедра в конце 1-й недели. Периваскулярный отек; г — 1-я неделя после введения АССККП в тромбированную вену. Варикозно-измененный (извитой) сосуд в мышечной ткани бедра; д — 2 нед после моделирования венозного тромбоза без последующего введения АССККП. В мышцах бедра, сосуд с организованным тромбом, визуально не связанным с эндотелием — «хвост» тромба (стрелка); е — 2 нед после тромбирования вены без применения АССККП. Организованный тромб прикреплен к поврежденному эндотелию — «голова» тромба (стрелка); ж — 3-я неделя после введения АССККП в тромбированную вену. В мышцах бедра прослойка плотной волокнистой соединительной ткани с частично облитерированными сосудами (стрелки); з — 4 нед после инъекции АССККП в тромбированную вену. Артерия (стрелка), проходящая в мышечной ткани, с утолщенной стенкой и складчатостью эндотелиальной выстилки. Окраска гематоксилином — эозином.

Далее в магистральной вене тромб лизируется, а в мелких сосудах фибрин организуется, постепенно поглощается фагоцитами, что часто приводит к облитерации просвета такого сосуда. Затем или параллельно развиваются новые сосуды, или питание мышечной ткани осуществляется за счет уже имеющихся коллатералей. В пользу поражения мелких сосудов после введения тромбина в магистральную вену также свидетельствует наличие в мышечной ткани варикозно-измененных сосудов. Подобный вид сосуды приобретают при повышении внутрисосудистого давления, например, при нарушении оттока вследствие тромбоза.

Учитывая появление в бедренных мышцах все большего числа сосудов венозного типа с ярким свечением в стенке ко 2-й неделе после тромбоза и введения АССККП, можно заключить, что восстановление кровотока в регионе тромбированной вены, в мелких ее ветвях, видимо, также тромбированных, максимально в данный срок.

К 3-й неделе, по-видимому, ангиогенез в поврежденных тканях был практически закончен и у всех животных количество объектов со специфическим свечением прогрессивно уменьшалось как в паравазальной соединительной ткани, так и в сосудах рубца на месте хирургического вмешательства. Сосуды, расположенные в мышечной ткани бедра имели широкий просвет, часто были варикозно расширены и извиты, но уже не содержали в стенке светящихся объектов.

Скорее всего, введенные АССККП (клетки и структуры, сформированные из введенных АССККП), взятые пусть и у генетически идентичной (линейные крысы), но все-таки другой особи, постепенно были вытеснены собственными клетками организма-реципиента [2, 3, 9]. Тем более, что введенные АССККП содержали в геноме чужеродную ДНК, кодирующую синтез GFP.

Присутствие в мышечной ткани сосудов с растянутым просветом и тонкой стенкой, а также варикозно-измененных, через 3 нед после операции может указывать как на блокаду выше места среза — в месте впадения этого сосуда в ранее тромбированную магистральную вену, так и на повышенный транспорт крови, не исключено, что для компенсации последствий тромбоза магистральной вены (коллатеральный кровоток).

О повышении давления в сосудах в прошлом, видимо, свидетельствует и складчатость эндотелиальной выстилки некоторых артерий, отмеченная через 4 нед после хирургического вмешательства. Не исключено, что такие изменения связаны с предшествующим венозным тромбозом. Когда

венозная часть сосудистого русла непроходима, в артериях повышается давление и их просвет расширяется. При нормализации условий гемодинамики просвет артерий возвращается к исходным показателям, но, видимо, какое-то время еще сохраняются гипертрофия оболочек (повышенное давление в прошлом) и складчатость эндотелия (растянутые структуры при нарушении венозного оттока).

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, профилактике и лечении тромбозомболических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний для снижения уровня смертности и ранней инвалидизации трудоспособного населения РФ»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Майбородин И. В., Шевела А. И., Бабко А. Н. и др. Морфологические результаты применения клеточных технологий для коррекции линейной атрофии кожи. Рос. журн. кожных и венерических болезней, 2010, № 1, с. 57–62.
2. Майбородин И. В., Якимова Н. В., Матвеева В. А. и др. Морфологический анализ результатов введения аутологичных стволовых стромальных клеток костномозгового происхождения в рубец матки крыс. Морфология, 2010, т. 138, вып. 6, с. 47–55.
3. Майбородин И. В., Якимова Н. В., Матвеева В. А. и др. Ангиогенез в рубце матки крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения. Бюл. экспер. биол., 2010, т. 150, № 12, с. 705–711.
4. Шевченко Ю. Л., Стойко Ю. М. и Лыткина М. И. Основы клинической флебологии. М., Медицина, 2005.
5. Chen Y. K., Jiang X. M. and Gong J. P. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor enhanced the resolution of venous thrombi. J. Vasc. Surg., 2008, v. 47, № 5, p. 1058–1065.
6. Gu Y., Qi L., Zhang J. et al. Middle-term outcome of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation for treatment of lower limb ischemia. Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2009, v. 23, № 3, p. 341–344.
7. Li X. Q., Meng Q. Y. and Wu H. R. Effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation on vein micro-environment in a rat model of chronic thrombosis. Chin. Med. J. (Engl), 2007, v. 120, № 24, p. 2245–2249.
8. Maiborodin I., Shevela A., Babko A. et al. Morphological substantiation of application of cellular technologies for correction of striae. Health, 2010, v. 2, № 12, p. 1430–1436.
9. Maiborodin I., Yakimova N., Matveeva V. et al. Angiogenesis in rat uterine scar after introduction after autologous mesenchymal stem cells of bone marrow origin. J. Biomed. Sci. Engineering, 2011, v. 4, № 3, p. 164–172.

10. Meng Q. Y., Li X. Q., Yu X. B. et al. Transplantation of VEGF165-gene-transfected endothelial progenitor cells in the treatment of chronic venous thrombosis in rats. *Chin. Med. J. (Engl)*, 2010, v. 123, № 4, p. 471–477.
11. Modarai B., Burnand K. G., Humphries J. et al. The role of neo-vascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb. Haemost.*, 2005, v. 5, p. 801–809.
12. Modarai B., Burnand K. G., Sawyer B. and Smith A. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation*, 2005, v. 111, № 20, p. 2645–2653.
13. Modarai B., Humphries J., Burnand K. G. et al. Adenovirus-mediated VEGF gene therapy enhances venous thrombus recanalization and resolution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2008, v. 28, № 10, p. 1753–1759.
14. Moldovan N. I. and Asahara T. Role of blood mononuclear cells in recanalization and vascularization of thrombi: past, present, and future. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2003, v. 13, № 7, p. 265–269.
15. Santo S. D., Tepper O. M., Ballmoos von M. W. et al. Cell-based therapy facilitates venous thrombus resolution. *Thromb. Haemost.*, 2009, v. 101, № 3, p. 460–464.
16. Tong Z., Gu Y., Zhang J. et al. Changes of endothelial progenitor cells in rats after bone-marrow stimulation. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2008, v. 22, № 10, p. 1218–1221.
17. Wessler S., Reimer S. M. and Sheps M. C. Biological assay of a thrombosis inducing activity in human serum. *J. Appl. Physiol.*, 1959, v. 14, p. 943–946.

Поступила в редакцию 19.02.2012

MORPHOLOGICAL RESULTS OF STROMAL STEM CELLS OF BONE MARROW ORIGIN INTO THE THROMBOSED VEIN IN EXPERIMENT

*I. V. Maiborodin, V. V. Morozov, Ya. V. Novikova,
V. A. Matveyeva, L. V. Artemyeva, A. L. Matveyev,
S. V. Khomeniuk and S. V. Marchukov*

Using the methods of luminescent microscopy, the results of injection of autologous multipotent stromal (mesenchymal) stem cells of bone marrow origin (SSCBMO) containing GFP gene, into thrombosed hindlimb vein were studied in 226 male Wag rats. It was found that the restoration of blood flow through the thrombosed main vein was not always the result of thrombolysis. No signs of incorporation of injected SSCBMO into the wall of thrombosed vessel, clot recanalization or collateral formation were detected. In experimental thrombosis model with thrombin administration and main vein ligation, the thrombosis of its small branches also took place. The restoration of blood flow occurred via either blood clot recanalization or obliteration of thrombosed vessels and the outgrowth of the new ones. SSCBMO were found to participate in both of these processes resulting in faster restoration of a blood flow in the tissue microregion of thrombosed vein. Gradually the injected SSCBMO and the structures formed with their participation, were replaced by the own cells of a recipient organism.

Key words: *multipotent stromal (mesenchymal) stem cells of bone marrow origin, venous thrombosis, blood clot recanalization, angiogenesis, blood flow restoration*

The Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS Siberian Branch, Novosibirsk