

© Коллектив авторов, 2015
УДК 612.423:616.14-005.6:599.323.4

*И.В. Майбородин, В.В. Морозов, В.А. Матвеева, Н.В. Оноприенко, Г.А. Частикин,
Ю.В. Серяпина, С.В. Мошак*

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОМОЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЛИМФОТОКА В РЕГИОНЕ ТРОМБИРОВАННОЙ ВЕНЫ

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

На самцах крыс линии Wag, массой 180–200 г в возрасте 6 мес методом люминесцентной микроскопии изучали возможность формирования лимфатических сосудов в результате введения аутологичных мультипотентных стромальных клеток костномозгового происхождения (АМСККП) с трансфицированным геном зеленого флюоресцентного белка в тромбированную вену бедра. Животных выводили из эксперимента через 4 сут, 1, 2, 3, 4 и 5 нед после введения АМСККП. Контролем служили интактные крысы, животные с венозным тромбозом без введения АМСККП и применением АМСККП без предварительного моделирования венозного тромбоза. В экспериментальной и в каждой контрольной группах на каждую временную точку было использовано по 11–12 животных (всего — 226). При лигировании магистральной вены с последующим введением раствора тромбина, кроме тромбоза кровеносных сосудов, присутствуют морфологические признаки тромбоза лимфатического русла и лимфостаза: расширение просвета лимфатических сосудов, истончение их оболочек, интенсивно окрашенное неоднородное содержимое. Введенные в тромбированную вену АМСККП принимают прямое участие в лимфангиогенезе как в соединительной ткани вокруг вены, ее тканевом регионе, так и в области регионарных лимфатических узлов. На это указывает яркое специфическое свечение как отдельных клеток в стенке лимфатических сосудов, так и всех их оболочек вместе с клапанами при воздействии ультрафиолетовым светом.

Ключевые слова: мультипотентные стромальные клетки, блокада лимфатического русла, лимфангиогенез, венозный тромбоз

В последнее время постоянно растет количество пациентов с тромботическими поражениями сосудистой системы. В связи с этим одной из важнейших проблем современной медицины во всем мире является лечение флеботромбозов [4]. Восстановление микроциркуляции в тканях региона тромбированного сосуда проходит через развитие коллатеральных сосудов и реканализацию тромба.

Имеются данные, что аутологичные мультипотентные стромальные клетки костномозгового происхождения (АМСККП) участвуют в ангиогенезе при экспериментальном флеботромбозе. Это приводит к более быстрому восстановлению кровотока в тканевом микрорайоне пораженной вены [2, 3]. Постепенно введенные АМСККП и структуры, сформированные с их участием, вытесняются собственными клетками организма-реципиента [2, 3, 10].

Однако в научных публикациях полностью отсутствуют результаты исследований воздей-

ствия таких клеток на лимфатические сосуды, находящиеся в регионе тромбированной вены, хотя давно известны сопутствующие изменения лимфатической системы при недостаточности венозного оттока [6, 9, 11, 12, 16].

В связи с изложенным цель настоящего исследования — установление возможности использования АМСККП для восстановления нарушенного лимфотока в регионе тромбированной вены в эксперименте.

Материал и методы. В качестве модели были использованы самцы крыс линии Wag массой 180–200 г в возрасте 6 мес. Все манипуляции осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г.; приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13 ноября 1984 г.).

АМСККП получали, культивировали и трансфицировали ДНК плазмиды, содержащей ген зеленого флюоресцентного белка (GFP) [2, 3, 10]: АМСККП 2-го пассажа, полученные от крысы указанной линии, трансфицировали ДНК плазмиды

Сведения об авторах:

Майбородин Игорь Валентинович (e-mail: imai@mail.ru), Матвеева Вера Александровна, Оноприенко Наталья Валентиновна, Частикин Геннадий Анатольевич, Мошак Сергей Васильевич, лаборатория стволовой клетки, Морозов Виталий Валерьевич, Серяпина Юлия Валерьевна, лаборатория инвазивных медицинских технологий, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

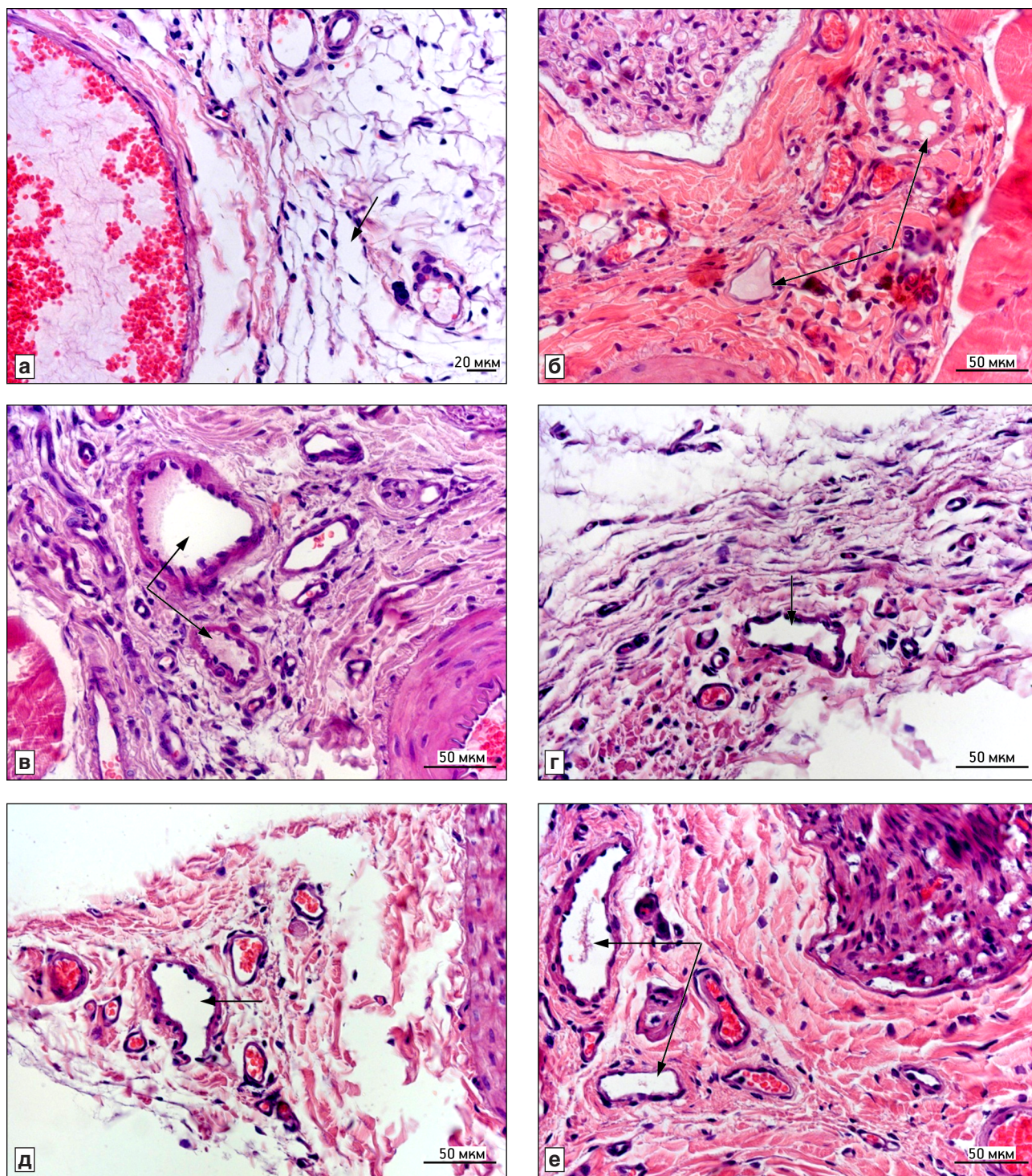
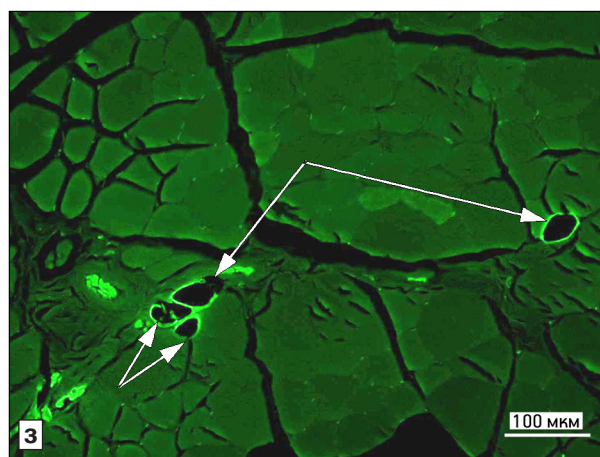
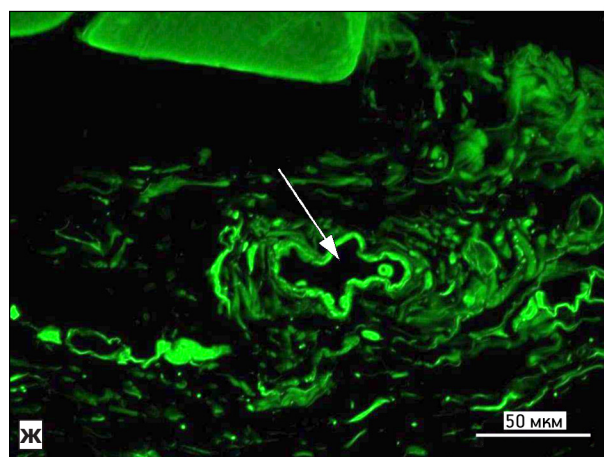
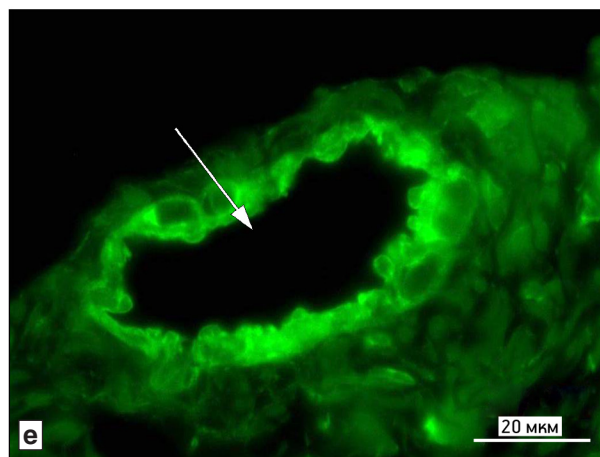
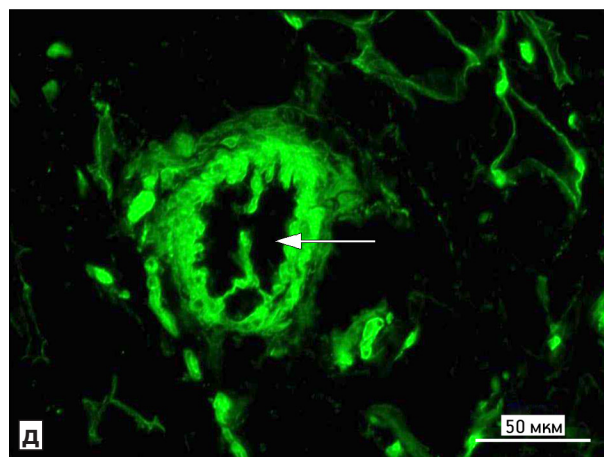
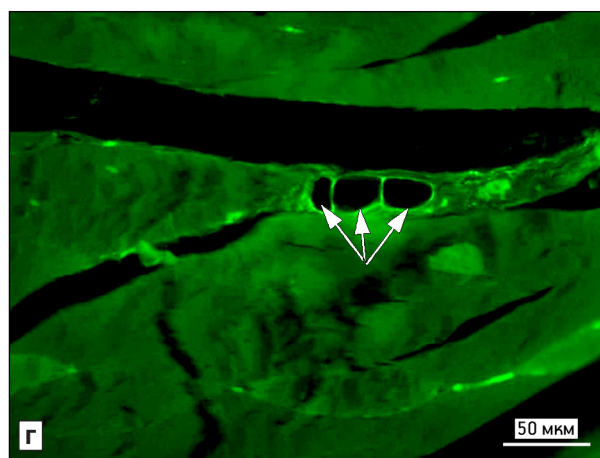
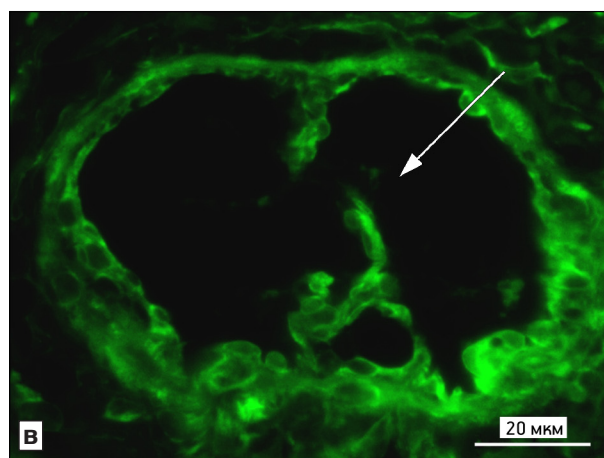
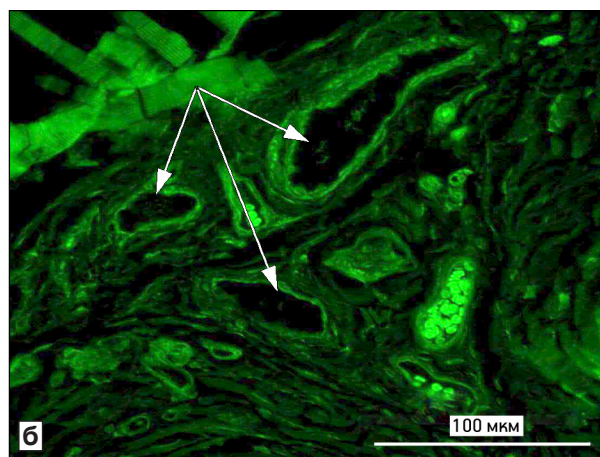
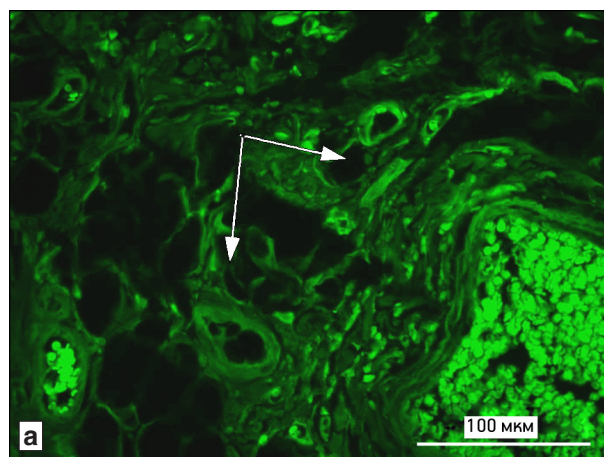


Рис. 1. Лимфатическое русло бедра крыс при экспериментальном флеботромбозе и применении аутологических мультипотентных стромальных клеток костномозгового происхождения (АМСККП).

а — небольшой лимфатический сосуд с очень тонкими стенками и хорошо различимым просветом (стрелка) у интактной крысы; б — значительно склерозированная соединительная ткань сосудистого пучка с лимфатическими сосудами (стрелки), имеющими широкий просвет и эозинофильное неоднородное содержимое через 1 нед после моделирования венозного тромбоза без применения клеточных технологий; в — склерозированная соединительная ткань вокруг сосудисто-нервного пучка, расширенные лимфатические сосуды с толстыми стенками с признаками склероза и эозинофильным содержимым (стрелки) через 1 нед после введения АМСККП в тромбированную вену; г — умеренно склерозированная соединительная ткань и лимфатические сосуды со склерозированными стенками и оптически пустым просветом (стрелка) через 3 нед после моделирования венозного тромбоза без использования АМСККП; д — склерозированная паравазальная соединительная ткань и лимфатические сосуды со склерозированными стенками и оптически пустым просветом (стрелка) через 3 нед после введения АМСККП в вену без моделирования тромбоза; е — значительно склерозированная соединительная ткань и лимфатические сосуды со склерозированными стенками и небольшим объемом содержимого (стрелки) через 3 нед после инъекции АМСККП в тромбированную вену. Окраска гематоксилином — эозином



pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., США), содержащей ген 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 (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Для моделирования венозного тромбоза использовали метод S.Wessler и соавт. [15], который был подробно описан ранее [2]. Сущность метода заключается в лигировании *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 АМСККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл) непосредственно в тромбированную вену. Животных выводили из эксперимента через 4 сут, 1, 2, 3, 4 и 5 нед после введения АМСККП. Контролем служили интактные крысы, животные с венозным тромбозом без введения АМСККП и с применением АМСККП без предварительного моделирования венозного тромбоза [3]. В экспериментальной и в каждой контрольной группах на каждую временную точку было использовано по 11–12 животных (всего $n=226$).

V. femoralis с окружающими тканями и регионарные (паховые) лимфатические узлы с паранодальными тканями фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 ч, обезживали в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в пластифицированный парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, изучали при увеличении светового микроскопа Axioimager M1 (Zeiss, Германия) до 1200 раз. Кроме того, неокрашенные срезы изучали с использованием того же микроскопа в режиме люминесценции с фильтром Alexa 488. Дифференцирование кровеносных и лимфатических сосудов проводили в соответствии с рекомендациями J.Casley-Smith [7] и J.R.Head, L.L.Seeling [8].

Результаты исследования. У интактных животных паравазально располагается жировая ткань с небольшими прослойками рыхлой волокнистой соединительной ткани, где находятся небольшие лимфатические сосуды с тонкими стенками и широким просветом, иногда оптически пустым, иногда со слабоэозинофильным гомогенным содержимым, там же встречаются единичные лейкоциты (рис. 1, а).

У всех интактных крыс и животных после моделирования венозного тромбоза без последующего использования клеточных технологий при изучении тканей в отраженном ультрафиолетовом свете специфически флюоресцирующих структур обнаружено не было как в паравазальной соединительной ткани, так и в стенке всех кровеносных и лимфатических сосудов, а также и в паранодальных тканях (рис. 2, а, б). В просвете кровеносных сосудов за счет аутофлюоресценции светились эритроциты (см. рис. 2, а, б).

Через 4 сут после создания венозного тромбоза без последующего использования клеточных технологий в соединительной ткани вокруг сосудистого пучка лимфатические капилляры имели тонкие стенки и были оптически пустыми. Иногда встречались сосуды с толстыми склерозированными стенками и также оптически пустым просветом.

При внутривенном введении АМСККП без предварительного создания тромбоза в области сосудистого пучка лимфатические сосуды были с тонкими стенками и оптически пустым просветом. Флюоресцирующие объекты при использовании люминесцентной микроскопии отсутствовали.

При тромбозе с последующим применением АМСККП в тканях рядом с сосудистым пучком были обнаружены множество лимфатических сосудов и капилляров со светящимися стенками. В некоторых случаях светился весь сосуд, в других — только отдельные клетки в его оболочках. Признаков тромбоза и непроходимости таких

Рис. 2. Лимфатические сосуды у крыс после использования аутологичных мультипотентных стромальных клеток костномозгового происхождения (АМСККП) на фоне флеботромбоза.

а — в стенке магистральных сосудов (стрелки) и в паравазальной соединительной ткани у интактного животного специфическое свечение отсутствует, флюоресценция эритроцитов в сосудах ярче фона; б — сосудисто-нервный пучок бедра через 3 нед после моделирования тромбоза без коррекции; специфически светящиеся объекты рядом с магистральными сосудами (стрелки) отсутствуют, кроме аутофлюоресценции эритроцитов; в — крупный лимфатический сосуд с клапанами, полностью построенный из клеток с ярко светящейся цитоплазмой (стрелка) в сосудисто-нервном пучке бедра спустя 1 нед после введения АМСККП в тромбированную вену; г — 1 нед после применения АМСККП для коррекции флеботромбоза, флюоресценция стенок сосудов с широким просветом (стрелки) в мышечной ткани бедра, признаков тромбоза в сосудах нет; д — 3 нед после введения АМСККП в вену без моделирования тромбоза. В жировой ткани вокруг пахового лимфатического узла расположен лимфатический сосуд с яркой флюоресценцией во всех оболочках и клапанах (стрелка), на фоне ярко светящейся цитоплазмы клеток видны более темные ядра; е — 3 нед после инъекции АМСККП в тромбированную вену. Лимфатический сосуд (стрелка) с яркой флюоресценцией всех оболочек, на фоне светящейся цитоплазмы клеток видны темные ядра; ж — флюоресценция в оболочках сосуда (стрелка) в мышцах бедра через 4 нед после введения АМСККП в вену без моделирования тромбоза; з — лимфатические сосуды с растянутым просветом и светящимися оболочками (стрелки) в мышцах бедра спустя 4 нед после применения АМСККП на фоне флеботромбоза

сосудов не было, но иногда имелись слабовыраженные склеротические изменения.

Через 1 нед после моделирования венозного тромбоза без последующего применения клеточных технологий в значительно склерозированной соединительной ткани вокруг сосудистого пучка были расположены лимфатические сосуды с широким просветом, тонкой стенкой и однородным слабоэозинофильным содержимым. Там же присутствовали сосуды с более интенсивно окрашенным содержимым, оно уже не было однородным, а имело множество уплотнений, оптически пустых мест и перетяжек (см. рис. 1, б). Такой вид, вероятно, свидетельствует о тромбозе этих компонентов лимфатического русла в регионе.

В группе крыс с введением АМСККП без тромбирования вены лимфатические сосуды в соединительной ткани не имели значительных изменений: были тонкостенными и с оптически пустым просветом.

При тромбозе с последующим применением АМСККП в склерозированной соединительной ткани возле магистральных сосудов содержались множество расширенных лимфатических сосудов и капилляров, многие из сосудов имели толстые стенки с признаками склероза и эозинофильным содержимым (см. рис. 1, в). Такие объекты чаще всего не имели флюоресценции, но в редких случаях там содержались крупные лимфатические сосуды с клапанами, полностью построенные из клеток с ярко светящейся цитоплазмой и темными ядрами (см. рис. 2, в). В мышцах бедра иногда в тонких стенках расширенных лимфатических капилляров наблюдалась флюоресценция (см. рис. 2, г).

После моделирования венозного тромбоза без последующего использования АМСККП к 2-недельному сроку склероз ткани в области сосудисто-нервного пучка оставался отчетливо выраженным. Там присутствовали разные по размерам лимфатические сосуды и капилляры со склерозированными стенками и признаками тромбоза: неоднородное интенсивно окрашенное содержимое.

В результате применения АМСККП без сопутствующего венозного тромбоза соединительная ткань рядом с магистральными сосудами также была склерозирована и там располагались лимфатические капилляры и сосуды, некоторые из которых имели широкий просвет и признаки тромбоза.

На фоне введения АМСККП в тромбированную вену в склерозированной соединительной ткани рядом с магистральными сосудами содержались лимфатические сосуды разного диаметра и капилляры со слабым свечением или вообще

без флюоресценции их оболочек. Иногда в лимфатических сосудах имелись признаки лимфостаза. Наблюдалось слабое, но достаточно хорошо заметное специфическое свечение расширенных лимфатических сосудов, проходящих в толще мышц бедра. Полностью светились тонкие стенки сосудов, и иногда в светящихся клетках было видно темное ядро.

Через 3 нед после моделирования тромбоза без последующей коррекции выраженность склероза в соединительной ткани вокруг магистральных сосудов несколько уменьшилась. Лимфатические сосуды также были менее склерозированы и не имели признаков тромбоза (см. рис. 1, г).

В результате инъекции АМСККП без моделирования тромбоза склероз соединительной ткани сохранялся на уровне такового в предыдущий срок (см. рис. 1, д). Флюоресцирующих объектов в стенке лимфатических капилляров и сосудов обнаружено не было, однако, в жировой ткани вокруг лимфатических узлов было расположено множество различного размера кровеносных и лимфатических сосудов с ярким свечением во всех их оболочках. При этом флюоресценция была отмечена даже в структурах клапанов таких сосудов. Часто на фоне ярко светящейся цитоплазмы было видно более темное ядро (см. рис. 2, д).

После введения АМСККП в тромбированную вену в склерозированной соединительной ткани присутствовали лимфатические капилляры и сосуды, стенки которых также имели признаки склероза (см. рис. 1, е). Иногда в таких сосудах было содержимое, но признаки тромбоза или лимфостаза уже отсутствовали: просвет не расширен, содержимого мало, оно однородное, окрашено не интенсивно. В основном рядом с магистральными сосудами были расположены компоненты лимфатического русла без специфического свечения. Иногда там содержались и сосуды с оболочками, в которых светились все клетки. Они имели ярко флюоресцирующую цитоплазму и более темное ядро (см. рис. 2, е). В мышцах бедра также были расположены крупные лимфатические капилляры с широким просветом и свечением стенок, но в основном оно было незначительно выше фона.

Через 4 нед после моделирования венозного тромбоза без применения АМСККП в области сосудистого пучка были обнаружены только склеротические изменения. Лимфатические сосуды были тонкостенными и оптически пустыми.

После инъекции АМСККП в вену без моделирования тромбоза выраженность склероза в соединительной ткани вокруг сосудисто-нервного пучка была меньше, чем у животных предыдущей

группы. Лимфатические сосуды были оптически пустыми и имели тонкие стенки. Однако при изучении материала в отраженном ультрафиолетовом свете были обнаружены многочисленные лимфатические сосуды со светящимися стенками, проходящие как возле магистральных сосудов, так и между пучками волокон мышцы бедра (см. рис. 2, ж). Имелись также широкие капилляры с очень тонкими светящимися стенками. Однако, наряду со светящимися сосудами, были и сосуды без свечения в своих структурах.

На фоне введения АМСККП в тромбированную вену паравазальная соединительная ткань сильно склерозирована. Лимфатические сосуды были оптически пустыми, с тонкими стенками и с незначительными признаками их склероза. Возле магистральных сосудов в лимфатических структурах светящихся объектов не было. Однако в толще мышц бедра были обнаружены многочисленные светящиеся лимфатические капилляры и сосуды с широким просветом и тонкими стенками (см. рис. 2, з).

Через 5 нед в группах крыс после моделирования флеботромбоза без использования клеточных технологий, после введения АМСККП без предварительного тромбоза и при введении АМСККП в тромбированную вену выраженность склероза в области сосудистого пучка значительно уменьшилась. Лимфатические сосуды были оптически пустыми и имели тонкие, слегка склерозированные стенки. Специфически светящиеся объекты в оболочках компонентов лимфатического русла отсутствовали.

Обсуждение полученных данных. Признаки непроходимости лимфатического русла при экспериментальном флеботромбозе появлялись только через 1 нед после операции и исчезали к 3-й неделе.

Любой воспалительный процесс затрагивает микроциркуляторное русло. В тканях происходит увеличение лимфопродукции на фоне блокады как кровеносных, так и лимфатических сосудов. Эта реакция направлена на ограничение участка воспаления и предотвращение распространения антигенов, токсинов и инфекционных агентов по всему организму посредством системы микроциркуляции.

Наиболее вероятно, что явления лимфостаза у животных с венозным тромбозом связаны как с действием тромбина, так и с воспалением вследствие хирургических манипуляций. Видимо, часть тромбина из лигированной вены попадает в ткани, например, через инъекционное отверстие, оттуда всасывается в лимфатическую систему и приводит к тромбозу некоторых лимфатических сосу-

дов. Воспалительная реакция, даже асептическая, также может являться причиной лимфостаза, и признаки блокады лимфатических сосудов, пусть и не значительно выраженные, наблюдались и в группах животных с введением АМСККП без предшествующего тромбоза — с однократной операцией.

Рядом с сосудисто-нервным пучком при использовании АМСККП на фоне тромбированной вены уже через 4 сут, когда еще не было морфологических признаков лимфостаза и тромбоза, присутствовали сосуды с флюоресцирующими клетками в оболочках. Исчезают светящиеся объекты в стенке таких сосудов к 4-й неделе.

Недостаточность лимфотока при блокаде лимфатических сосудов, по-видимому, компенсируется ростом новых сосудов в регионе. Введенные АМСККП участвуют в ангиогенезе, причем не только кровеносных сосудов [2, 3, 10], но и лимфатических. Об этом свидетельствует яркое свечение как отдельных клеток в стенках лимфатических сосудов и капилляров, так и всех их оболочек, в том числе и клапанов.

Доказательством того, что лимфатические сосуды в соединительной ткани вокруг сосудисто-нервного пучка были сформированы именно в результате введения АМСККП и из них, является частичное или полное свечение стенки этих сосудов. Ген GFP, введенный в ДНК этих клеток, неизменным передается дочерним клеткам и клеткам следующих поколений и позволяет найти структуры, сформированные из них, которые точно также светятся в отраженном ультрафиолетовом свете [5, 13, 14]. В случае тромбоза вены без последующего введения АМСККП объекты с ярким свечением в окружающих тканях отсутствуют. Свечение оболочек сосудов, обнаруженное в наших исследованиях, указывает еще и на то, что именно введенные АМСККП прямо, а не опосредованно (через цитокины или другие клеточные сигналы) участвуют в формировании сосудов.

По-видимому, введение АМСККП ускоряет процесс развития (восстановления) лимфатической сети за счет привнесения в место повреждения клеточных элементов, способных к дифференцировке в любом, в том числе эндотелиоцитарном и перицитарном, направлениях. На деление и миграцию собственных стволовых клеток к месту лимфангиогенеза требуется какое-то время. Введение АМСККП непосредственно в регион с недостаточностью лимфотока способствует их быстрому включению в процессы формирования сосудов. Таким образом экономится время, необ-

ходимое для пролиферации и миграции собственных стволовых клеток данного организма.

Не исключено, что нарушения микроциркуляции при воспалении (прямое повреждение сосудов, отек, тромбоз и пр.) и соответствующие изменения тканевого обмена вызывают дифференцировку введенных АМСККП в направлении клеток-предшественников эндотелиоцитов и перицитов лимфатических сосудов, а ускорение роста сосудов приводит к улучшению питания поврежденных тканей и способствует их более быстрой репарации.

В норме появление лимфатических сосудов взамен поврежденных (лигирование) или тромбированных (тромбин и тканевый детрит с фибрином после операций) происходит как за счет роста уже существующих сосудов в данном регионе, так и путем формирования их *de novo*. Тот и другой процесс проходят при участии собственных стволовых клеток, которые находятся в красном костном мозгу и могут быть выделены из циркулирующей крови и других тканей.

Со временем ангиогенез в поврежденных тканях завершается, и введенные АМСККП (клетки и структуры, сформированные из введенных АМСККП), взятые у генетически идентичной (линейные крысы), но все-таки другой особи, постепенно вытесняются собственными клетками организма-реципиента. Тем более, что введенные АМСККП содержали в геноме чужеродную ДНК, кодирующую синтез GFP.

После введения АМСККП в тромбированную вену было отмечено свечение лимфатических сосудов и капилляров в мышце бедра с 1-й недели. Исчезли светящиеся объекты у этой группы крыс к 5-й неделе.

Как было показано ранее [2], при моделировании венозного тромбоза по методу S. Wessler и соавт. [15] вместе с магистральными кровеносными сосудами тромбируются и мелкие сосуды, проходящие в толще мышц бедра. Это происходит в результате того, что после введения тромбина он присутствует не только в самом сосуде, но и распространяется ретроградно (вследствие перевязки магистрального сосуда и нарушения оттока) на его ветви, осуществляющие сбор крови от тканей.

Видимо, каким-то образом повреждаются и лимфатические сосуды, проходящие рядом с кровеносными. Восстановление лимфотока в тканевом регионе тромбированной вены также происходит с участием введенных АМСККП, которые встраиваются в формирующиеся сосуды или полностью образуют их оболочки. При внутривенном введении АМСККП могут продвигаться ретроградно по ветвям вены или по периваскулярным

пространствам и быстро оказываться в мышечной ткани. В бедренных мышцах АМСККП формируют не только кровеносные [2], но и лимфатические сосуды.

Свечение сосудов паранодальной ткани и капсулы паховых лимфатических узлов было отмечено через 3–4 нед. Исчезновение светящихся объектов из стенки сосудов жировой ткани вокруг лимфатических узлов и их капсулы произошло к концу наблюдения, к 5-й неделе.

Вместе с блокадой лимфатического русла в области сосудистого пучка, причиной которой являются тромбин и постоперационное воспаление, блокируются и лимфатические сосуды на протяжении, наиболее вероятно, вследствие этих же факторов. В том числе происходит блокада лимфотока на уровне паранодальных тканей и даже капсулы лимфатических узлов, где имеется своеобразный клапанный аппарат, регулирующий ток лимфы из афферентных сосудов в субкапсульный синус [1].

Сначала лимфангиогенез начинается в месте применения АМСККП, но затем или из-за их миграции, или даже прорастания сосудов, полностью построенных из введенных АМСККП, появляются светящиеся объекты в тканях рядом с регионарными лимфатическими узлами — по ходу лимфотока. Видимо, именно поэтому ангиогенез на таком отдалении начинается несколько позже, спустя 3–4 нед.

При лигировании магистральной вены с последующим введением раствора тромбина, кроме тромбоза кровеносных сосудов, происходит блокирование регионарного лимфотока. Введенные в тромбированную вену АМСККП с трансфицированным геном GFP принимают прямое участие в формировании новых лимфатических сосудов в соединительной ткани вокруг вены, ее тканевом регионе и в области регионарных лимфатических узлов. На это указывает яркое специфическое свечение как отдельных клеток в стенке лимфатических сосудов, так и всех их оболочек вместе с клапанами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Майбородин И.В., Гаврилин В.Н., Бородин Ю.И., Рейхерт В.Э. Клапаны краевого синуса лимфатических узлов // Морфология. 1996. Т. 110, вып. 6. С. 86–88.
2. Майбородин И.В., Морозов В.В., Новикова Я.В. и др. Морфологические результаты введения стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения в тромбированную вену в эксперименте // Морфология. 2012. Т. 142, вып. 4. С. 54–61.
3. Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А. и др. Морфологический анализ результатов введения аутологических стволовых стромальных клеток костномозгового проис-

- хождения в рубец матки крыс // Морфология. 2010. Т. 138, вып. 6. С. 47–55.
4. Шевченко Ю.Л., Стойко Ю.М., Лыткина М.И. Основы клинической флебологии. М.: Медицина, 2005.
 5. Arpornmaeklong P., Brown S.E., Wang Z., Krebsbach P.H. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells // *Stem. Cells Dev.* 2009. Vol. 18, № 7. P. 955–968.
 6. Cárdenas A., Bataller R., Arroyo V. Mechanisms of ascites formation // *Clin. Liver Dis.* 2000. Vol. 4, № 2. P. 447–465.
 7. Casley-Smith J. The structure and Functioning of the Blood Vessels, Interstitial Tissues and Lymphatics. *Lymphangiology*. Stuttgart, New York: Schattauer. 1983. Ch. 2. P. 27–143.
 8. Head J.R., Seeling L.L.Jr. Lymphatic vessels in the uterine endometrium of virgin rats // *J. Reprod. Immunol.* 1984. Vol. 6, № 3. P. 157–166.
 9. Ikeda R., Michitaka K., Yamauchi Y. et al. Changes in gastrointestinal lymph and blood vessels in patients with cirrhotic portal hypertension // *J. Gastroenterol.* 2001. Vol. 36, № 10. P. 689–695.
 10. 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. Vol. 4, № 3. P. 164–172.
 11. Oikawa H., Masuda T., Sato S. et al. Changes in lymph vessels and portal veins in the portal tract of patients with idiopathic portal hypertension: a morphometric study // *Hepatology.* 1998. Vol. 27, № 6. P. 1607–1610.
 12. Parasher V.K., Meroni E., Malesci A. et al. Observation of thoracic duct morphology in portal hypertension by endoscopic ultrasound // *Gastrointest. Endosc.* 1998. Vol. 48, № 6. P. 588–592.
 13. Stephan S.J., Tholpady S.S., Gross B. et al. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect // *Laryngoscope.* 2010. Vol. 120, № 5. P. 895–901.
 14. Tasso R., Fais F., Reverberi D. et al. The recruitment of two consecutive and different waves of host stem/progenitor cells during the development of tissue-engineered bone in a murine model // *Biomaterials.* 2010. Vol. 31, № 8. P. 2121–2129.
 15. Wessler S., Reimer S.M., Sheps M.C. Biological assay of a thrombosis inducing activity in human serum // *J. Appl. Physiol.* 1959. Vol. 14. P. 943–946.
 16. Yamauchi Y., Ikeda R., Michitaka K. et al. Morphometric analysis of lymphatic vessels in primary biliary cirrhosis // *Hepatol. Res.* 2002. Vol. 24, № 2. P. 107.

Поступила в редакцию 28.12.2014

Получена после доработки 28.02.2015

MORPHOLOGICAL CHANGES AFTER THE USE OF MULTIPOTENT STROMAL CELLS OF BONE MARROW ORIGIN TO RESTORE THE LYMPH FLOW IN THE REGION OF THROMBOSED VEIN

I. V. Maiborodin, V. V. Morozov, V. A. Matveyeva, N. V. Onopriyenko, G. A. Chastikhin, Yu. V. Seryapina, S. V. Moshak

In the male Wag rats aged 6 months with the body mass of 180–200 g the luminescent microscopy was used to examine the possibility of lymphatic vessel formation after injection into thrombosed vein of the thigh of autologous multipotent stromal cells of bone marrow origin (AMSCBMO) transfected with green fluorescent protein gene. Animals were sacrificed 4 days and 1, 2, 3, 4 and 5 weeks after the injection of AMSCBMO. The control group consisted of intact rats, animals with venous thrombosis receiving no injection of AMSCBMO and those injected with AMSCBMO but without the prior modelling of venous thrombosis. In each experimental and control groups at each time point 11–12 animals were used (total number equal to 226). After the main vein ligation with the subsequent injection of thrombin solution, in addition to the thrombosis of the blood vessels, morphological signs of thrombosis of the lymphatic bed and lymphostasis were present: the dilation of lymphatic vessel lumen, thinning of their layers, intense staining of their luminal heterogeneous content. AMSCBMO, injected into thrombosed vein, were found to directly participate in lymphangiogenesis in the connective tissue around vein, its tissue region and in the area of regional lymph nodes. This is indicated by bright specific luminescence of both individual cells in the wall of the lymphatic vessels, and all their tunics together with the valves, when exposed to UV light.

Key words: *multipotent stromal cells, lymph flow blockade, lymphangiogenesis, venous thrombosis*

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