

5. Маркосова Т.Г. Электронно-цитохимическое исследование эндоцитоза и внутриклеточного пищеварения в эпидермальных клетках *Convoluta convoluta* (Turbellaria, Acoela). Морфология ресничных червей. Труды Зоологическ. ин-та АН СССР, 1989, т. 195, с. 26–35.
6. Рябов С.И. и Наточин Ю.В. Функциональная нефрология. СПб., Лань, 1997.
7. Benito J. and Pardos F. Hemichordata. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, 1997, v. 15, p. 15–101.
8. Christensen E.I., Verroust P.J. and Nielsen R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch.*, 2009, v. 458, № 6, p. 1039–1048.
9. Clauss W.G. Epithelial transport and osmoregulation in annelids. *Can. J. Zool.*, 2001, v. 79, № 2, p. 192–203.
10. Ferraris J.D. Histological study of secretory structures of nemerteans subjected to stress: II. Cerebral organs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1979, v. 39, № 4, p. 434–450.
11. Kirk A., Campbell S., Bass P. et al. Differential expression of claudin tight junction proteins in the human cortical nephron. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2010, v. 25, № 7, p. 2107–2119.

Поступила в редакцию 14.09.10

ULTRASTRUCTURAL PECULIARITIES OF THE TISSUE ADAPTATION OF THE EPITHELIA IN SOME INVERTEBRATES AND IN MAN

M.V. Stolyarova and E.I. Valkovich

Using electron microscopy, the reactive changes of epidermal cells in response to hypotonic conditions were studied in the representatives of three groups of marine invertebrates characterized by different levels of organization — *Convoluta convoluta* (Turbellaria, Acoela), *Amphiporus lactifloreus* (Nemertini) and *Saccoglossus mereschkowskii* (Enteropneusta). On the basis of functional resemblance of absorption and pinocytosis, the peculiarities of absorptive proximal tubule epithelium of human kidney under intensive protein transport were examined at the ultrastructural level. The resemblance of the epithelial tissue reactive changes in response to the damaging was demonstrated factors in invertebrates and in humans.

Key words: *epithelia, ultrastructure, reactive changes, invertebrates, man*

Department of Histology and Embryology, St. Petersburg State Pediatric Medical Academy

© Коллектив авторов, 2010
УДК 611.018:618.14:599.323.4

И.В. Майбородин, Н.В. Якимова, В.А. Матвеева, О.Г. Пекарев, Е.И. Майбородина, Е.О. Пекарева и О.К. Ткачук

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОМЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РУБЕЦ МАТКИ КРЫС

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А.И. Шевела), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, e-mail: imai@mail.ru

Методами световой микроскопии изучали результаты введения аутологичных стромальных (мезенхимальных) стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП) с трансфицированным геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) в рубец маточного рога у крыс. Через 1 нед после введения АССККП в сформированный рубец справа (2 мес после перевязки) в нем присутствовали крупные группы кровеносных сосудов, содержащие форменные элементы крови, которые отсутствовали в рубце рога на противоположной стороне. При исследовании неокрашенных срезов в отраженном ультрафиолетовом свете было обнаружено яркое свечение в эндотелии и наружной оболочке сосудов рубца маточного рога только на стороне инъекции АССККП. Сделано заключение, что после введения в рубец АССККП они формируют кровеносные сосуды за счет дифференцировки в эндотелиоциты и перициты. Экспрессия гена GFP не только в эндотелии сосудов, но и в их наружных оболочках указывает на то, что возможна дифференцировка АССККП как в эндотелиальном, так и в перичитарном направлениях.

Ключевые слова: *матка, рубец, стромальные стволовые клетки костномозгового происхождения, ангиогенез*

Воспалительные заболевания женских половых органов и, как их следствие, спаечный процесс, приводят к нарушениям репродуктивной функции. Изучение особенностей этиопатогенеза при развитии спаечного процесса и синехий

в полости матки позволяет обосновать новые направления его лечения и профилактики.

Согласно современным представлениям, физиологическая и репаративная регенерация тканей у взрослого организма осуществляется

при непосредственном участии низкодифференцированных клеток-предшественников или стволовых клеток. Основным источником последних является костный мозг, способный, в дополнение к своей основной — гемопоэтической функции, производить предшественники клеточных элементов большого числа тканей организма.

Костный мозг содержит два типа стволовых клеток: гемопоэтические и стромальные, называемые также мезенхимальными [3]. Считается, что они оба имеют потенциал к дифференцировке в клетки различных фенотипов [15].

Во взрослом организме, помимо костного мозга, мультипотентные стволовые клетки были обнаружены в жировой, мышечной и нервной тканях, в периферической крови и крови пуповины/плаценты. Более того, в зависимости от микроокружения стволовые клетки способны преодолевать гемопоэтический/мезенхимальный барьер, так как обладают высокой пластичностью дифференцировки и трансдифференцировки.

Имеются многочисленные сообщения об эффективности клеточных технологий при лечении ишемической болезни сердца [14, 18, 23, 27]. Клеточно-опосредованные стратегии в лечении этой патологии основаны на имплантации непосредственно в ишемизированный миокард или в коронарное русло костномозговых клеток. При этом преследуются две цели: реваскуляризация миокарда и устранение дефицита функциональных клеточных элементов миокарда.

J.M. Isner [16] выделил из костного мозга предполагаемые эндотелиальные клетки-предшественники, у которых некоторые поверхностные антигены были общими с таковыми у кроветворных стволовых клеток (CD34, CD133, Flk-1, Tie-2). Эти клетки вводили иммунодефицитным крысам с предварительно выполненной окклюзией коронарной артерии. Впоследствии было обнаружено, что клетки донора скапливались преимущественно в областях неангиогенеза внутри инфарктной зоны. Повышение количества капилляров в единице объема сопровождалось значительным улучшением функции и параметров левого желудочка по сравнению с таковыми в контрольной группе. Схожие работы с аналогичными результатами были выполнены на различных моделях другими исследователями [10, 12, 17, 19].

Н. Kamihata и соавт. [18] показали, что интенсивный неоваскулогенез после имплантации костномозговых клеток в область инфаркта миокарда обусловлен не только непосредственным участием аутологичных стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП), но и

значительной экспрессией этими клетками таких факторов ангиогенеза, как фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин и др. M. Takahashi и соавт. [27] также поддержали идею паракринных механизмов влияния костномозговых клеток на миокард за счет цитокинов.

Так как хроническая ишемическая болезнь сердца характеризуется рубцовыми изменениями, расширением полостей и ухудшением работы желудочков, что может предотвращаться только полным восстановлением миокарда, были проведены исследования возможности его восстановления на модели ишемической болезни сердца у мышей с использованием сердечных прогениторных клеток, которые имплантировали в перирубцовую зону. Также локально стимулировали непосредственно зону рубца ростовым фактором гепатоцитов и инсулиноподобным ростовым фактором-1. Известно, что ростовой фактор гепатоцитов является хемоаттрактантом для сердечных прогениторных клеток, а инсулиноподобный фактор вызывает мощную клеточную пролиферацию и увеличивает жизнеспособность этих клеток [23]. Результаты исследования показали уменьшение зоны рубца на 42% при обоих методах воздействия на миокард, а также улучшение объемной желудочковой конфигурации. Сокращение рубцовой зоны было связано с формированием новых кардиомиоцитов, при котором сердечные прогениторные клетки вырабатывают матриксные металлопротеиназы. При анализе хромосом кардиомиоцитов было показано, что в процессе восстановления миокарда нет «слияния» клеток. В качестве альтернативы введения стволовых клеток авторы предлагают использование комбинации ростовых факторов [23].

Обеднение популяции циркулирующих клеток костного мозга с возрастом — важное лимитирующее условие клеточной терапии, в качестве подготовки к проведению лечения в таких случаях предлагают использовать малые молекулы, полимеры, ростовые факторы или их комбинацию [9].

В экспериментах на крысах было показано, что гипоксически подготовленные в течение 24 ч перед трансплантацией в периинфарктную зону АССККП увеличивают экспрессию факторов жизнеспособности и васкулогенеза: индуцируемого гипоксией фактора-1, ангиопоэтина-1, сосудистого эндотелиального фактора роста, а также рецепторов — Flk-1, эритропоэтина, Vcl-2 и Vcl-xL, что в итоге приводит к улучшению ангиогенеза через усиление паракринных механизмов [14].

Можно заключить, что в литературе, посвященной лечению рубцов с использованием клеточ-

ных технологий, имеются 2 основные гипотезы о судьбе имплантированных АССККП. Согласно первой, АССККП при продолжении их дифференцировки в тканях с гипоксией принимают непосредственное участие в неоангиогенезе и реваскуляризации [10, 12, 17, 19]. По мнению других исследователей, эффект применения АССККП, главным образом, обусловлен экспрессией ими различных факторов ангиогенеза и других цитокинов [14, 18, 27]. М. Rota и соавт. [23] считают, что имеет место комбинация прямого участия стволовых клеток с паракринными механизмами. Таким образом, нет единого мнения и остается до конца не ясным, что происходит с АССККП после их имплантации в ткани и органы.

В связи с малой эффективностью широко применяемых методик лечения рубцов миометрия целью настоящего исследования была попытка коррекции данной патологии с использованием клеточных технологий, а также изучение судьбы стволовых клеток после введения их тем или иным способом в организм.

Материал и методы. В качестве модели были использованы самки крыс линии Wag массой 180–200 г в возрасте 6 мес. В асептических условиях проводили нижнесрединную лапаротомию. Маточные рога выводили в рану и тщательно обкладывали стерильными салфетками. Под конец каждого рога вблизи тела матки подводили кетгутую лигатуру и перевязывали в указанном отделе (рис. 1, а). Брюшную полость ушивали наглухо послойно. Визуально через 1, 2 и 3 мес оценивали характер, время формирования непроходимости и синехий в маточных рогах. В каждой группе было минимум по 6 животных.

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 TurboFect (Fermentas life sciences, Inc., Канада) согласно рекомендациям производителя (протокол для суспензионных клеток), используя 1×10^6 клеток в 1 мл суспензии, 4 мкг ДНК плазмиды и 10 мкл реагента TurboFect.

Через 4 ч после трансфекции клетки разводили не трансфицированными клетками в соотношении 1:2,5 соответственно и 100 мкл смеси при релапаротомии и после удаления нелизированных остатков шовного материала вводили в область сформированного рубца (2 мес после перевязки) маточного рога справа.

Оставшиеся после трансплантации клетки поддерживали в культуре в течение 10 сут 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 трансфекции оценивали

как долю светящихся клеток относительно всех клеток в камере Горяева. Трансфицированные клетки в разбавленной культуре составляли около 3%.

Как и в большинстве случаев при использовании технологии, основанной на введении плазмидной ДНК, наблюдали только временную экспрессию введенного гена GFP в АССККП. Культивирование клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1, без селекции (не использовали дженетицин — G418, Sigma, США), приводило к снижению количества клеток, синтезирующих GFP, вследствие их вытеснения нетрансфицированными клетками. Тем не менее, спустя 1 нед в культуре трансфицированных клеток 1-го пассажа, высеянных при плотности 5000 клеток на 1 см^2 , наблюдали клетки, синтезирующие GFP.

Для культивирования АССККП использовали реактивы фирмы Sigma (США), пластиковые культуральные планшеты и флаконы фирмы Orange (Бельгия).

Фрагменты маточного рога с рубцом и синехиями, биоптированные через 1 нед после введения АССККП, фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 ч, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Неокрашенные срезы толщиной 5–7 мкм изучали под световым микроскопом Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1500 раз в режиме люминесценции с фильтром Alexa 488.

Все исследования проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», все манипуляции осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом.

Результаты исследования. Через 1 мес имело место развитие умеренного спаечного процесса в области малого таза без вовлечения верхних этажей брюшной полости. Обнаружены изменения маточных рогов, проявляющиеся наличием гидрометры выше места перевязки до перешеечной части маточной трубы (см. рис. 1, б). В просвете рога матки имелось прозрачное, серозное содержимое, без гнойных элементов. В месте перевязки маточных рогов присутствовал инкапсулированный шовный материал.

При изучении структуры маточных рогов при увеличении в 6–10 раз были обнаружены формирование синехий в месте перевязки, гипертрофия и растяжение стенки матки, формирование полноценной непроходимости, в зоне сужения просвета — атрофия эндометрия (см. рис. 1, в).

Для подтверждения полученных данных было проведено исследование спустя 2 и 3 мес. При вскрытии брюшной полости обращало на себя внимание еще более выраженное расширение маточных рогов и увеличение объема серозной жидкости в их просвете выше места перевязки прогрессировавшее, по мере увеличения срока опыта. Во всех случаях в этих группах были найдены полностью сформированные синехии в просвете маточных рогов с развитием атрофии эндометрия в месте лигирования (см. рис. 1, г–е).

В эти сроки исследования в ряде случаев также были обнаружены нити шовного материала.

Иногда наблюдалось восстановление объема маточного рога с той или иной стороны. Однако в этих случаях было отмечено значительное развитие спаечного процесса, что дает возможность предположить самопроизвольный разрыв рога матки с выходом содержимого в брюшную полость и формированием спаек.

Через 1 нед после введения АССККП в сформированный рубец справа (2 мес после перевязки рога матки) в нем присутствовали крупные группы кровеносных сосудов, содержащие форменные элементы крови; таких групп сосудов не было в рубце на левой стороне (рис. 2, а, в).

При исследовании неокрашенных срезов правого маточного рога в отраженном ультрафиолетовом свете было обнаружено яркое свечение в эндотелии и наружной оболочке сосудов рубца. В эндометрии и миометрии были найдены незначительные явления отека и множество мелких светящихся объектов, скорее всего, сосудов капиллярного типа (см. рис. 2, а, б).

Свечение оболочек сосудов в срезах маточного рога противоположной стороны было практически на уровне фона, группы сосудов отсутствовали. В миометрии и эндометрии не было мелких светящихся объектов и признаков отека (см. рис. 2, в, г).

Обсуждение полученных данных. У крысы маточный рог представляет собой тонкую трубку, один конец которой сообщается с полостью тела матки, а другой — с маточной трубкой, открывающейся в полость брюшины у поверхности яичника. В норме у млекопитающих происходит отток содержимого маточных труб в брюшную полость с последующим его всасыванием.

При перевязке маточного рога не обнаружено оттока жидкостного содержимого маточных рогов в брюшную полость, наоборот, во всех случаях наблюдали отчетливо выраженную гидрометру. Спаек между маткой, ее рогами, трубами и яичниками отмечено не было. Можно предположить, что нарушение оттока было связано с воспалительной реакцией, направленной на ограничение патологического очага, однако при длительности эксперимента 1–3 мес и наличии воспаления в структурах матки и ее рогов было бы более вероятно ожидать развития пиометры, но во всех случаях просвет маточных рогов был заполнен прозрачным серозным содержимым.

Необходимо отметить поздние сроки рассасывания «лизируемого» шовного материала (кетгут

[1], в то время как у человека кетгут рассасывается в течение 15–20 сут.

К сожалению, после использования АССККП более быстрого рассасывания рубца и купирования явлений гидрометры обнаружено не было. Но данное исследование было проведено на малом количестве наблюдений (6 крыс на точку исследования), для окончательного заключения об эффективности этой процедуры в отношении состояния рубца требуется повторение на более значительном числе животных. Однако обращает на себя внимание развитие сосудистой сети в месте инъекции АССККП. Доказательством того, что указанные группы сосудов были сформированы именно в результате введения АССККП и из них, является свечение участков стенки этих сосудов. Ген GFP, введенный в ДНК АССККП, неизменно передается дочерним клеткам и клеткам следующих поколений. Эти клетки и структуры, сформированные из них, точно также светятся в отраженном ультрафиолетовом свете.

До недавнего времени преобладало мнение, что ангиогенный ответ в постнатальной жизни выражается в процессе роста уже существующих капилляров. Однако сейчас убедительно доказано, что небольшая, но биологически значимая часть эндотелиоцитов, участвующих в формировании новых капилляров, имеет костномозговое происхождение [6, 24, 25].

Эндотелиоциты человека делятся каждые 3 года, а в сосудах сетчатки каждые 14 лет. Однако эндотелиоциты могут быть индуцированы к репликации при ответе на патологическую или физиологическую стимуляцию. В некоторых случаях костномозговая клеточная популяция эндотелиальных клеток-предшественников может полностью замещаться каждые 5 сут. Это несомненное преимущество, когда физиологические обстоятельства требуют увеличения кровоснабжения, как в заживающих ранах, так и при подготовке к имплантации оплодотворенной яйцеклетки в богато васкуляризованный эндометрий [4].

В 1962 г. была впервые продемонстрирована возможность существования циркулирующих эндотелиоцитов [21]. Было показано, что на изолированной от контакта с окружающими тканями дакроновой заплате, находящейся в стенке просвета действующего сосудистого протеза аорты (экспериментальное протезирование грудного отдела аорты свиньи), формируется соединительная ткань. Спустя 14 сут и позже после имплантации дакрона определялся слой эндотелиальных и других клеток, включая мононуклеары, фибробласты, а также клетки инородных тел. Выявляемые

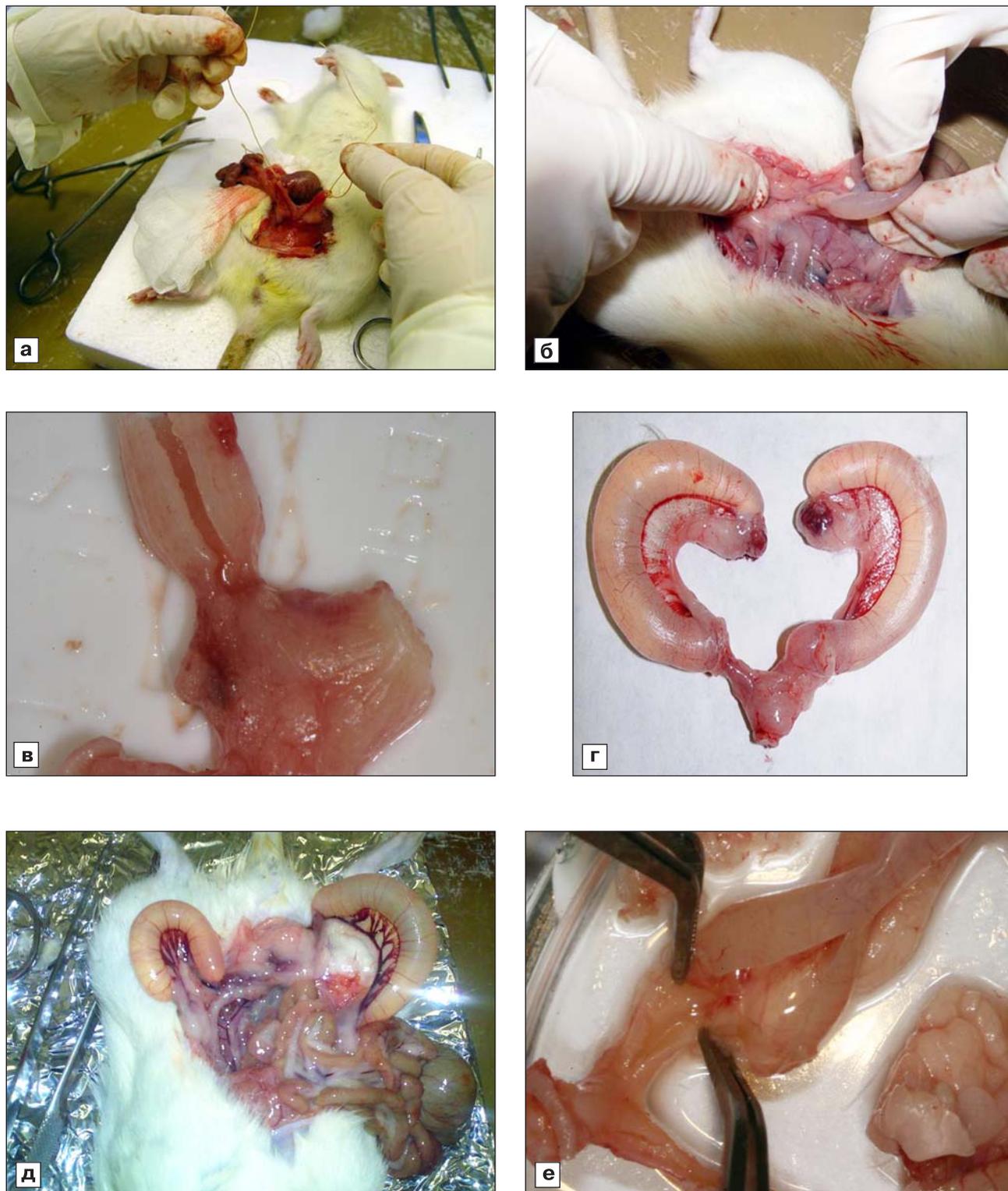


Рис. 1. Формирование гидрометры после перевязки рогов матки у крыс.

а — срединная лапаротомия у крысы под ингаляционным наркозом. Выделены матка и придатки. На рога матки в нижней трети наложены кетгуттовые лигатуры; б — формирование двусторонней гидрометры в рогах матки и отсутствие оттока содержимого из просвета маточных рогов и труб в брюшную полость через 1 мес после начала эксперимента; в — синехии и атрофия эпителия в роге матки спустя 1 мес после наложения лигатур. Расширение и гипертрофия стенки дистальной части рога; г — прогрессирование двусторонней гидрометры и отсутствие оттока серозного содержимого в брюшную полость через 2 мес после перевязки маточных рогов кетгуттом; д — животное со вскрытой брюшной полостью, где расположены кистозно-измененные рога матки, спустя 3 мес после начала эксперимента; е — полное нарушение строения стенки маточного рога, формирование рубца и непроходимости, потеря эластичности дистального отдела стенки рога в результате перерастяжения из-за отсутствия оттока через 3 мес после наложения кетгуттовых лигатур.

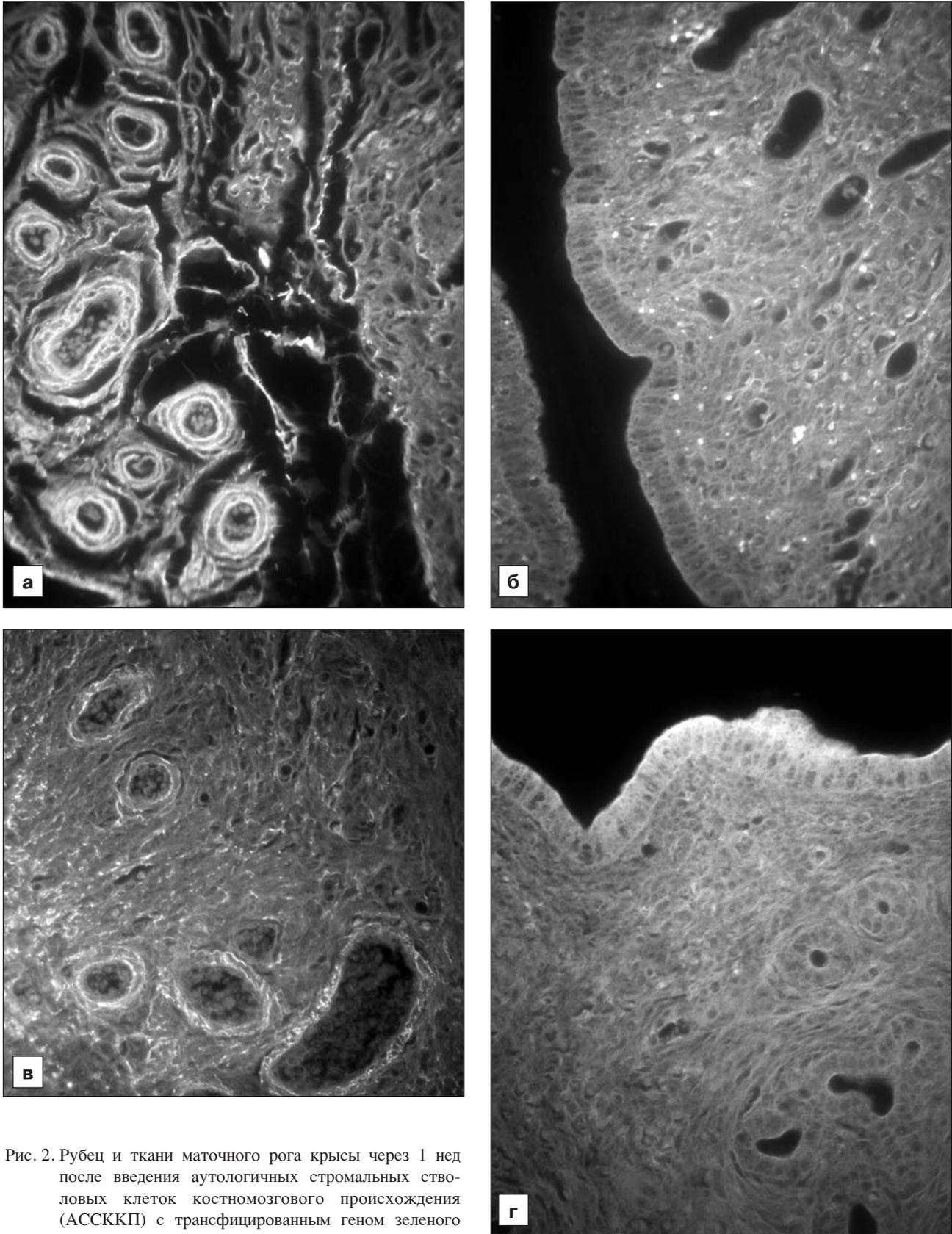


Рис. 2. Рубец и ткани маточного рога крысы через 1 нед после введения аутологичных стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП) с трансфицированным геном зеленого флуоресцентного белка.

а — группы кровеносных сосудов в рубце правого маточного рога (сторона инъекции взвеси АССККП), в большинстве сосудов светятся четко очерченная эндотелиальная выстилка и наружная оболочка; б — в эндометрии и миометрии правого рога матки присутствуют множество мелких светящихся объектов (сосуды капиллярного типа) и явления интерстициального отека; в — в рубце маточного рога слева сосудов значительно меньше, свечение их структур практически на уровне фона; г — в левом маточном роге светящиеся объекты и признаки отека отсутствуют. Неокрашенные срезы в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром Alexa 488. Ув.: а, б, г — 280; в — 320.

клетки могли иметь только один источник — циркулирующую кровь [21, 26].

В экспериментах на собаках было показано, что через несколько дней на эндотелиальных поверхностях непроницаемых сосудистых протезов появляются изолированные островки из эндотелиоцитов, как при установке дакронового протеза в нижней полой вене, так и при имплантации в грудном отделе аорты. Это также подтверждает, что источник эндотелиоцитов — циркулирующая кровь [25]. Данные исследования были подтверждены при трансплантации костного мозга после тотального облучения собак на модели с генетическими различиями донорских циркулирующих эндотелиоцитов и клеток реципиента [24].

Кровеносные сосуды формируются двумя взаимодействующими клеточными типами: эндотелиоцитами, выстилающими внутреннюю поверхность сосудистого русла, и периваскулярными клетками, называемыми перицитами, окутывающими внешнюю поверхность сосудистой трубки [2]. Перициты не только включены в гемодинамический процесс, но также играют активную роль в формировании сосудов. Ряд исследователей выдвигают гипотезу, что эндотелиоциты и перициты развиваются из предшественника, общего с гемопоэтическими клетками. Эта гипотеза основана на том, что развивающиеся гемопоэтические и эндотелиальные клетки имеют общие поверхностные маркеры и что гемопоэтические клетки могут развиваться из эндотелиоцитов главных эмбриональных кровеносных сосудов [5, 7, 22].

Наиболее часто происхождение перицитов связывают с мезенхимальной стволовой клеткой [8]. После инициации дифференцировки клетки-предшественники перицитов хемотаксически прилипают к эндотелиоцитам капилляров в начале ангиогенеза [13]. Кроме того, имеются сообщения, что перициты могут образовываться из эндотелиоцитов при их трансдифференцировке, это наблюдали в брюшной части аорты [11], а также в сердечных клапанах [20].

Свечение эндотелия и наружной оболочки сосудов, обнаруженное в наших исследованиях, указывает на то, что именно введенные АССККП прямо, а не опосредованно (через цитокины или другие клеточные сигналы) участвуют в формировании сосудов, возможно, из-за присутствия мультипотентных клеток, уже стимулированных к дифференцировке в эндотелиоцитарном или перицитарном направлениях. Также не исключено, что гипоксия тканей в результате перевязки структур вместе с сосудами стимулирует диффе-

ренцировку введенных АССККП в эндотелиоциты [14].

Дополнительным свидетельством ангиогенеза в результате применения АССККП является то, что группы сосудов в рубце были обнаружены только справа — со стороны их введения, а не с другой стороны.

Экспрессия введенного гена GFP не только в эндотелии сосудов, но и в их наружных оболочках, скорее всего, является свидетельством того, что эндотелиоциты и перициты имеют единую клетку-предшественника или что возможна дифференцировка АССККП как в эндотелиоцитарном, так и в перицитарном направлениях. Как уже указано, по мнению многочисленных исследователей, эндотелиальные клетки и перициты имеют общего предшественника с гемопоэтическими клетками [5, 7, 22].

Кроме этого, одностороннее развитие сосудов и присутствие в их стенке светящихся объектов указывают на то, что в данном случае введенные АССККП не мигрируют из места инъекции, не разрушаются и не служат только «строительным материалом» или «сигналом» к началу ангиогенеза для собственных клеток организма-донора. Во всех этих случаях, конечно, возможно выделение из разрушенных АССККП светящегося белка и трансфицированного гена GFP и поглощение их соседними клетками. Однако белки и фрагменты ДНК, попавшие в клетки в результате фагоцитоза или пиноцитоза, подвергаются деградации с потерей способности к люминесценции и встраиванию в геном, т.е. при разрушении введенных АССККП свечение должно быть минимальным (выход светящегося белка GFP из АССККП), и очень быстро полностью исчезнуть, тем более в данном случае не должно быть четко очерченных и ограниченных светящихся структур.

За счет увеличения числа сосудов, особенно «молодых» с тонкой стенкой, улучшаются обменные процессы в тканях с рубцом. В результате оптимизации условий жизнедеятельности и функционирования фибробластов может интенсифицироваться обмен компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани рубца, может произойти омоложение коллагеновых и эластических волокон, что далее проявится появлением более тонких структур, упорядочением их расположения [28] и, возможно, восстановлением проходимости рогов матки со сформированными синехиями.

Таким образом, при моделировании синехий матки лигированием маточных рогов у крыс было обнаружено отсутствие оттока через трубы в

брюшную полость, возможно, именно наличие клапанного аппарата в истмической и ампулярной частях маточных труб создает барьер для восходящего проникновения инфекции из полости матки в брюшную полость. Можно предположить, что данные о возможности развития перитонита восходящим путем при гинекологической патологии сильно преувеличены. В месте формирования сужения маточного рога происходят атрофия эндометрия и образование синехий, что является не только визуальным, но и морфологическим подтверждением непроходимости данных структур.

После перевязки рога матки крыс незлизованные остатки шовного материала — кетгута присутствуют в окружающих тканях, по меньшей мере, в течение 3 мес. Не исключено, что наличие данных инородных тел в тканях матки после наложения швов при операциях кесарева сечения, миомэктомии и т.п. может снижать прочность рубца и стенки данного органа и являться причиной разрыва матки в процессе последующих беременностей и родов.

После введения в рубец АССККП в нем происходит увеличение числа сосудов за счет процессов неоангиогенеза. В данном случае АССККП не мигрируют и не разрушаются в месте введения, а формируют кровеносные сосуды за счет дифференцировки в эндотелиоциты и перициты. Через 1 нед после введения АССККП сосуды, сформированные из этих клеток, уже могут функционировать, стенка их имеет все оболочки, и они содержат форменные элементы крови.

Экспрессия гена GFP не только в эндотелии сосудов, но и в их наружных оболочках указывает на то, что возможна дифференцировка АССККП, продуцирующих GFP, как в эндотелиальном, так и в перицитарном направлениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Майбородин И.В., Майбородина Е.И., Якимова Н.В. и др. Абсорбируемый шовный материал в организме. *Арх. пат.*, 2008, т. 70, № 2, с. 51–53.
2. Bergers G. and Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.*, 2005, v. 7, № 4, p. 452–464.
3. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 2001, v. 98, № 8, p. 2396–2402.
4. Carmeliet P. and Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, v. 407, № 6801, p. 249–257.
5. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J. Intern. Med.*, 2004, v. 255, № 5, p. 538–561.
6. Carmeliet P. and Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb. Haemost.*, 2001, v. 86, № 1, p. 289–297.
7. Cho H., Kozasa T., Bondjers C. et al. Pericyte-specific expression of Rgs5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation. *FASEB J.*, 2003, v. 17, № 3, p. 440–442.
8. Creazzo T.L., Godt R.E., Leatherbury L. et al. Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, v. 60, p. 267–286.
9. Dimmeler S. and Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ. Res.*, 2008, v. 102, № 11, p. 1319–1330.
10. Fukushima S., Varela-Carver A., Coppen S.R. et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation*, 2007, v. 115, № 17, p. 2254–2261.
11. Gittenberger-de Groot A.C., DeRuiter M.C., Bergwerff M. and Poelmann R.E. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, v. 19, № 7, p. 1589–1594.
12. Grauss R.W., Winter E.M., Tuyn van J. et al. Mesenchymal stem cells from ischemic heart disease patients improve left ventricular function after acute myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007, v. 293, № 4, p. H2438–H2447.
13. Hellström M., Kalén M., Lindahl P. et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 1999, v. 126, № 14, p. 3047–3055.
14. Hu X., Yu S.P., Fraser J.L. et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2008, v. 135, № 4, p. 799–808.
15. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells*, 2000, v. 18, № 1, p. 1–9.
16. Isner J.M. Tissue responses to ischemia: local and remote responses for preserving perfusion of ischemic muscle. *J. Clin. Invest.*, 2000, v. 106, № 5, p. 615–619.
17. Jackson K.A., Majka S.M., Wang H. et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.*, 2001, v. 107, № 11, p. 1395–1402.
18. Kamihata H., Matsubara H., Nishiue T. et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 2001, v. 104, № 9, p. 1046–1052.
19. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.*, 2001, v. 7, № 4, p. 430–436.
20. Nakajima Y., Mironov V., Yamagishi T. et al. Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor beta3. *Dev. Dyn.*, 1997, v. 209, № 3, p. 296–309.
21. Poole J.C., Sabiston D.C. Jr, Florey H.W. and Allison P.R. Growth of endothelium in arterial prosthetic grafts and following endarterectomy. *Surg. Forum*, 1962, v. 13, p. 225–227.

22. Ribatti D., Vacca A., Nico B. et al. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr. Mol. Med.*, 2002, v. 2, № 6, p. 537–543.
23. Rota M., Padin-Iruegas M.E., Misao Y. et al. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ. Res.*, 2008, v. 103, № 1, p. 107–116.
24. Shi Q., Rafii S., Wu M.H. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, v. 92, № 2, p. 362–367.
25. Shi Q., Wu M.H., Hayashida N. et al. Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J. Vasc. Surg.*, 1994, v. 20, № 4, p. 546–557.
26. Stump M.M., Jordan G.L. Jr, Debakey M.E. and Halpert B. Endothelium grown from circulating blood on isolated intravascular dacron hub. *Am. J. Pathol.*, 1963, v. 43, p. 361–367.
27. Takahashi M., Li T.S., Suzuki R. et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006, v. 291, № 2, p. H886–H893.
28. Tsuji T. and Sawabe M. Elastic fibers in striae distensae. *J. Cutan. Pathol.*, 1988, v. 15, № 4, p. 215–222.

Поступила в редакцию 02.02.10
Получена после доработки 06.05.10

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THE RESULTS OF INJECTION OF THE AUTOLOGOUS STROMAL MARROW-DERIVED STEM CELLS INTO THE UTERINE SCAR IN RATS

*I.V. Maiborodin, N.V. Yakimova, V.A. Matveyeva,
O.G. Pekarev, Ye.I. Maiborodina Ye.O. Pekareva and
O.K. Tkachiuk*

The results of injection of the autologous stromal (mesenchymal) marrow-derived stem cells (ASMSC) transfected with green fluorescent protein (GFP) gene into the rat uterine scar were studied by methods of light microscopy. One week after ASMSC injection into the formed scar on the right side (2 months after the uterine horn ligation), large groups of blood vessels containing the formed elements of blood were found, while these were absent in the uterine scar on the opposite side. The study of the unstained sections in the reflected ultraviolet light demonstrated bright luminescence in the vessel endothelium and adventitia in the uterine horn scar only at the side of ASMSC injection. It is suggested that after the injection of ASMSC in the uterine horn scar, they form blood vessels as result of a differentiation into endotheliocytes and pericytes. The expression of GFP gene not only in vascular endothelium, but also in their adventitia, indicated that the differentiation ASMSC is possible in both endotheliocytes and in pericytes.

Key words: *uterus, scar, stromal marrow-derived stem cells, angiogenesis*

Center of Modern Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk