На правах рукописи

АНИКЕЕВ

Анатолий Анатольевич

ПАТОМОРФОЛОГИЯ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ОСТРОЙ ВЕНОЗНОЙ БЛОКАДЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

14.03.02 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск) и в Институте молекулярной патологии и патоморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск)

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор **Лушникова Елена Леонидовна**

Официальные оппоненты:

Жукова Наталья Анатольевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н.Ворожцова» СО РАН, лаборатория фармакологических исследований, ведущий научный сотрудник.

Красильников Серегей Эдуардович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н.Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт онкологии и нейрохирургии, директор.

Черданцева Татьяна Михайловна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, патологической анатомии и медицинской генетики, заведующая кафедрой.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Барнаул)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2021 г. в _____ ч на заседании совета Д 001.048.05 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» http://frcftm.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Клинникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Восстановление артериального и венозного кровотока при развитии венозных и артериальных тромбоэмболических заболеваний является одной из наиболее актуальных и важных проблем современной медицины, поскольку частота встречаемости, в частности, тромбофлебита поверхностных вен нижних конечностей в Российской Федерации варьируется от 0,3 – 0,6 до 0,7 – 1,8 случаев у индивидов соответственно в молодом и пожилом возрасте (Богачев В.Ю. и др., 2016). В целом, по официальным данным, частота встречаемости венозных тромбозов в Российской Федерации превышает среднемировые показатели (Лобастов К.В., 2019). При этом истинная встречаемость тромбоза и локальной блокады сосудов остается неизвестной, так как заболевания и осложнения зачастую протекают без симптомов. Важно также подчеркнуть, что венозные и артериальные тромбоэмболические состояния могут представлять серьезную угрозу жизни из-за возможности тромбоэмболии легочной артерии.

Для устранения тромботических осложнений используются как хирургические методики лечения, которые имеют определенные недостатки (достаточно высокая частота местных осложнений), так и терапевтические подходы (назначение антикоагулянтных препаратов), применение которых также сопряжено с возможными негативными последствиями. В последне время предложены также малоинвазивные методики лечения тромбофлебитов, характеризующиеся низкой частотой рецидива и осложнений (Гавриленко А.В. и др., 2011; Кургинян Х.М., Раскин В.В., 2019).

Применение клеточных технологий, в частности, основанных на использовании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), представляет новое направление в регенеративной медицине, касающееся стимуляции регенераторных процессов в разных органах и тканях при патологических процессах разной интенсивности и продолжительности (Andreeva E. et al., 2017). Многие исследователи полагают, что МСК могут быть одним из основных компонентов клеточной терапии и регенеративной медицины из-за их способности продуцировать биологически активные молекулы и дифференцироваться в клетки других тканей, преимущественно мезенхимального происхождения (Hsuan Y.C. et al., 2016; Johnson C.L. et al., 2016; Wang L.T. et al., 2016). В дополнение к этим свойствам МСК способны к иммунной модуляции, которая может обеспечивать подавление иммунного ответа хозяина при использовании в аллогенных условиях. Эти клетки обладают иммунной привилегией из-за отсутствия или низкой экспрессии главного комплекса гистосовместимости класса II (MHC-II) и ко-стимулирующих молекул на поверхности клеток; они могут влиять на различные пути иммунного ответа за счет секреции растворимых факторов и из-за прямых межклеточных взаимодействий.

МСК могут быть выделены из различных источников, таких как костный мозг, скелетные мышцы, пульпа зуба, пуповина, периферическая кровь и жировая ткань, и они являются наиболее важными компонентами гомеостаза тканей, физиологического ремоделирования и репаративной регенерации (Crisan M. et al., 2008). Известно, что клетки-предшественники костного мозга (плюри-, мульти- и унипотентные линии стромальных клеток) принимают участие в естественном лизисе тромба (Modarai B. et al., 2008). Появление сосудов в тромбе, быстрое восстановление проходимости сосуда и восстановление тока крови в ишемизированных при тромбозе органах и тканях были успешно достигнуты в экспериментах на животных с цитокинами, стимулирующими ангиогенез (Moldovan N.I., Asahara T., 2003; Li X.Q. et al., 2007; Chen Y.K. et al., 2008; Santo S.D. et al., 2009).

Клетки-предшественники эндотелиоцитов также принимают участие в восстановлении тока крови по тромбированным венам. Введение таких клеток бестимусным голым крысам внутривенно через 2 – 4 сут после моделирования тромботического поражения нижней полой вены способствовало значительному увеличением тока крови в тромбе, что

подтверждено лазерной допплерометрией и обнаружением молодых сосудов в тромбе с применением иммуногистохимии (Santo S.D. et al., 2009).

Ранее экспериментально установлено воздействие костномозговых клеток-предшественников эндотелиоцитов молодых особей крыс, трансплантированных через бедренную вену в тромб нижней полой, на значительное увеличение содержания фактора роста сосудистого эндотелия, моноцитарного хемотаксического белка-1, ангиопоэтина-1, экспрессию мРНК (Li X.Q. et al., 2007). Восстановление тока крови может происходить через рост сосудов в тромбе, на который влияют эти клетки, что способствует раннему восстановлению микроциркуляции в тканевом микрорайоне вены с тромбом. Также аутологичные МСК костномозгового происхождения участвуют в образовании грануляционной ткани в месте хирургического вмешательства, что способствует более быстрому очищению тканей от детрита и антигенных веществ, раннему началу репарационных процессов и быстрому заживлению (Майбородин И.В. и др., 2012, 2013, 2015; Maiborodin I. et al., 2015, 2016).

Степень разработанности темы исследования. Нарушения венозного оттока происходят не только из-за тромбирования участка венозного русла, но и вследствие острых локальных препятствий току крови, например, лигирования или ограниченного повреждения вены во время хирургических манипуляций и травм. В связи с этим остается открытым вопрос о возможности применения клеточных технологий для лечения внезапно возникших препятствий венозному кровотоку, не связанных с поражением микроциркуляции всего микрорайона.

В работах, посвященных острым локальным нарушениям венозного кровотока, представлены в основном результаты исследований перевязывания вены при онкологических процессах для профилактики метастазирования и создания большой концентрации противоопухолевых препаратов (Qazi A.Q. et al., 2016; Vašek P. et al., 2016), лигирования селезеночной вены при портальной гипертензии (Colaneri R.P. et al., 2014; Rosado I.D. et al., 2016), блокады мезентериально-кавальных анастомозов в процессе трансплантации печени (Kamei H. et al., 2016; Parry A.T., White R.N., 2016), а также данные, касающиеся перевязывания и удаления участков вен для последующей трансплантации на место или в обход других патологически измененных или поврежденных сосудов (Stavridis G.T. et al., 1998; Bell C.L. et al., 2005). Однако в этих случаях очень редко изучается восстановление венозного оттока, только в единичных работах отмечено быстрое развитие коллатерального кровотока (Rosado I.D. et al., 2016; Calicchio K.W. et al., 2016), даже при выключении магистральной вены.

Стволовые клетки при лигировании вены, согласно данным литературы, применялись только для воздействия на регенерацию органов (чаще всего печени), которые находились в бассейне перевязанного сосуда (Kwon Y.J. et al., 2015; Treska V., 2016). О результатах использования мультипотентных клеток для восстановления кровотока в обход лигированной вены не сообщалось.

Цель исследования – установить особенности репаративных реакций при использовании аутологичных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костномозгового происхождения после острого локального нарушения венозного оттока в эксперименте.

Задачи исследования:

1. С помощью комплексного морфологического анализа (световой, люминесцентной микроскопии, иммуногистохимии, морфометрии) изучить процессы нарушения и восстановления кровотока в регионе магистральной вены после моделирования ее внезапной локальной блокады с последующей инъекцией аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с трансфицированным геном зеленого флюоресцентного белка.

2. Установить возможность миграции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, введенных в ткани с нарушенным венозным оттоком и без блокады магистральной вены.

3. Изучить характер структурной реорганизации регионарных лимфатических узлов (ЛУ) при венозной блокаде и введении аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с зеленым флюоресцентным белком.

4. Установить возможные местные и общие осложнения после применения клеточных технологий при моделировании локальной блокады магистральной вены.

5. Исследовать особенности морфологических изменений микроциркуляторного русла при флеботромбозе и локальном препятствии кровотоку по магистральной вене.

6. С помощью морфометрического анализа изучить выраженность воспалительной реакции в месте инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения при нарушенном венозном оттоке.

Научная новизна. Впервые проведено исследование возможности применения клеточной технологии, основанной на введении аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, при острой локальной блокаде магистральной вены в эксперименте. Отток крови от конечности сразу после наложения лигатуры осуществляется по более мелким коллатеральным венам, которые постепенно расширяются и реорганизуются, что происходит без участия введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Впервые для использования клеточных технологий при нарушении венозного оттока был применен приближенный к клиническим условиям способ: введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения инъекционно шприцом через кожу в проекции блокированной вены.

Впервые в эксперименте продемонстрировано, что процессы формирования сосудов грануляционной ткани после введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в область хирургического вмешательства у крыс появляются уже через 4 сут и нарастают до 2 нед. Аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения не только полностью формируют все оболочки новых сосудов, но и встраиваются в образующиеся из собственных клеток.

Впервые установлено, что фагоцитоз макрофагами аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с трансфицированной ДНК белка GFP и окрашенными Vybrant-CM-Dil мембранами сопровождается быстрой деградацией флюоресцентного протеина, тогда как Vybrant-CM-Dil или не разрушается ферментами лизосом, или разрушается очень медленно. В результате происходит накопление этого красителя в макрофагах, которые приобретают способность к интенсивной красной флюоресценции при облучении их ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина.

Впервые показано, что аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения и их детрит могут частично попадать в кровеносное и лимфатическое русло и оказываться в регионарных ЛУ. Впервые обнаружено, что в некоторых макрофагах лимфоидных узелков и мозгового вещества регионарных ЛУ могут содержаться фрагменты аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения.

Впервые показано, что введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в ткани может сопровождаться появлением обширных геморрагий как в месте инъекции, так и в регионарных ЛУ. Впервые отмечено, что инъекция аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения после хирургического вмешательства может приводить к формированию значительно более обширного рубца, чем на фоне такой же операции без их применения. Впервые показано, что локальное применение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения при ненарушенных кровообращении и лимфотоке и неповрежденных тканях может быть неэффективным вследствие быстрой элиминации введенных клеток из места инъекции.

Впервые проведено сравнительное морфологическое исследование изменений микроциркуляции при флеботромбозе и локальном препятствии кровотоку по магистральной вене. Основные различия изменений микроциркуляции при флеботромбозе и локальном препятствии кровотоку по магистральной вене заключаются в том, что при

тромбозе поражается участок сосуда на большом протяжении вместе с коллатералями, по которым тромбин ретроградно проникает глубоко в ткани и блокирует венозный отток даже по мелким сосудам, то есть нарушается кровообращение в значительном объеме тканей. Проходимость магистральной вены при тромбозе быстро восстанавливается, но длительное время сохраняются нарушения микроциркуляции тканевого региона, для устранения которых необходима стимуляция ангиогенеза с развитием новых кровеносных сосудов. При лигировании вены возникает локальная непроходимость сосуда, застой компенсируется коллатералями и перфорантными венами без необходимости стимулирования ангиогенеза с помощью МСК. Отсутствуют значительные изменения лимфатической системы региона, но рядом с веной длительное время сохраняются массивные геморрагии вследствие венозной гипертензии из-за реорганизации оболочек коллатеральных сосудов.

Впервые установлено, что инъекция аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения на фоне лигированной магистральной вены приводит к уменьшению в месте хирургического вмешательства выраженности лейкоцитарной инфильтрации и уменьшению численности нейтрофилов.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые знания об особенностях репаративных процессов при острой локальной блокаде магистральной вены в условиях применения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Установлено, что введенные аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения принимают участие в формировании грануляционной ткани в месте хирургического вмешательства, что интенсифицирует репарационные процессы и ускоряет восстановление поврежденных при операции тканей.

В практическом плане при проведении клеточной терапии необходимо учитывать возможность попадания части введенных МСК и их детрита в кровеносное и лимфатическое русло с диссеминацией по всему организму и фагоцитозом макрофагами даже в отдаленных от места введения тканях. Использование аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения может приводить к значительным нарушениям микроциркуляции как в месте инъекции, так и в регионарных ЛУ.

Следует учитывать, что инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения после хирургического вмешательства могут сопровождаться обширным рубцеванием, захватывающим и прилежащие ткани. Инъекционное введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения при ненарушенных кровообращении и лимфотоке и неповрежденных тканях может оказаться малоэффективным: в условиях интактного сосудистого русла, сохраненного венозного и лимфатического оттока, большая часть аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения может быстро элиминироваться из мест инъекции, распространиться по всему организму с миграцией в регионарные ЛУ.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на применении принципов и методов комплексного патоморфологического анализа реорганизации сосудистого русла при острой блокаде венозного оттока, индукции репаративных процессов с применением клеточных технологий, общих подходах к моделированию патологических процессов. Использованы современные методы комплексного патоморфологического анализа (световая, люминесцентная, конфокальная микроскопия, иммуногистохимия, морфометрический анализ) и обработки количественных данных (статистический анализ). Объект исследований – образцы бедренных мышц, магистральные (бедренные) вены задних конечностей и паховые ЛУ крыс после моделирования острой локальной блокады венозного оттока и применения клеточной технологии. Предмет исследования – особенности репаративных процессов и восстановления кровотока в тканевом микрорайоне блокированной вены после введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Введенные в область хирургического вмешательства аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения участвуют в формировании сосудов грануляционной ткани. При этом МСК не только полностью формируют все оболочки новообразованных сосудов, но и встраиваются в сосуды, формирующиеся из эндогенных клеток.

2. После инъекции в ткани аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения и их детрит могут частично попадать в кровеносное и лимфатическое русло с последующим их фагоцитозом периваскулярными макрофагами.

3. Введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в ткани способствует формированию обширных геморрагий как в месте инъекции, так и в регионарных лимфатических узлах.

4. При лигировании вены возникает локальная непроходимость сосуда, застой быстро компенсируется коллатералями, тогда как при флеботромбозе проходимость магистральной вены хоть и восстанавливается, но длительно сохраняются нарушения микроциркуляции в тканевом регионе, для устранения которых необходима стимуляция ангиогенеза.

5. Введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения способствует уменьшению выраженности воспалительного процесса в месте хирургического вмешательства.

Степень достоверности результатов. Использованные методы исследования (световая, люминесцентная, конфокальная микроскопия, иммуногистохимия, морфометрический анализ), способы моделирования острой локальной венозной блокады и методы статистической обработки количественных данных соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные результаты и сделать обоснованные выводы. Диссертация выполнена на достаточном экспериментальном материале (использованы 224 самца инбредных линейных крыс Wag, у которых моделировали острую локальную блокаду венозного оттока с введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с трансфицированной ДНК протеина GFP и дополнительно окрашенными мембранами Vybrant® CM-Dil). Сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах собственных исследований, не носят характера умозрительных заключений и вытекают из результатов работы.

Апробация работы. Результаты проведенного исследования доложены и обсуждены на XII международной конференции, посвященной 25-летию НИИ клинической и экспериментальной лимфологии «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (Новосибирск, 2016), 9-м Санкт-Петербургском венозном форуме (Санкт-Петербург, 2016) и на заседании научного персонала лабораторий стволовой клетки, инвазивных медицинских технологий, проблем репродукции, восстановительной медицины и лучевой диагностики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (Новосибирск, 2017), ученом совете Института молекулярной патологии и патоморфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск, 2020), на расширенном заседании отдела «Центр новых медицинских технологий» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, 2021).

Внедрение. Основные положения и выводы диссертационной работы, а также методы применения мезенхимальных стромальных клеток для коррекции венозной блокады в эксперименте используются при разработке новых лекарственных препаратов и физиотерапевтических способов восстановления микроциркуляции в отделе «Центр новых медицинских технологий» ФГБУН «Института химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (Новосибирск).

Личный вклад автора. Автором проведены планирование и разработка дизайна исследования, сформулированы его цель и задачи, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретированы и опубликованы основные результаты.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 10 – в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований и входящих в базы Web of Science и Scopus.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 251 странице компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, 6 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы, включающего 423 источника (79 отечественных и 344 иностранных авторов). Работа иллюстрирована 18 таблицами и 70 комбинированными микрофотографиями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Острую локальную непроходимость магистральной вены моделировали у крыс-самцов инбредной линии Wag возрастом 6 мес и массой 180 – 200 г с последующим введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Для применения клеточных технологий был выбран приближенный к клиническим условиям способ введения – шприцем через кожу в проекции блокированной вены.

Методы выделения, культивирования, определения физических, морфологических, фенотипических признаков и дифференцировочного потенциала аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения соответствовали литературным рекомендациям. Использовали подробный протокол трансфекции и способы оценки экспрессии введенного гена GFP в МСК, описанные ранее (Майбородин И.В. и др., 2013, 2015; Maiborodin I. et al., 2015, 2016). Клеточные мембраны аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения после трансфекции белка GFP дополнительно окрашивали раствором Vybrant® CM-Dil (Thermo Fisher Scientific, USA).

Под общим ингаляционным эфирным наркозом, при соблюдении правил асептики и антисептики, скальпелем или ножницами производили разрез кожи длиной до 3 см по внутренней стороне бедра до паховой складки. Тупым способом выделяли сосудистый пучок и накладывали лигатуру из поливолоконного плетеного шовного материала «Викрил 3/0» на v. femoralis в области паховой связки, как можно ближе к месту впадения к v. circumflexa ilium profunda. Через 1 сут непосредственно через кожу, после ее обработки спиртом, в проекции наложенной лигатуры вводили 100 мкл суспензии аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в культуральной среде ($1x10^6$ клеток в 1 мл суспензии).

В качестве контроля использовали следующие группы крыс: интактные; блокада вены без использования аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения; введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в область нормальной вены через 1 сут после разреза и ушивания кожи (ложнооперированные). Все манипуляции с животными осуществляли под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». На работу получено разрешение Локального комитета по медицинской этике Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Крыс выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 4 сут, 1, 2, 3, 4 и 5 нед. В каждый срок эксперимента проанализировано не менее 10 животных. Всего в эксперименте использованы 224 крысы.

Выделение аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их характеристики. Аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения получали после забора костного мозга из бедренных костей, биоптированных под эфирной анестезией у крыс-самцов вышеуказанной линии (Майбородин И.В. и др., 2010 – 2013, 2015). Клетки суспендировали и помещали в пластиковые баллоны («Nunk», Дания), через 2 сут культививирования неприкрепившиеся клетки сливали вместе со средой. Адгезированные к пластику клетки культивировали в среде α-МЕМ с прибавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («Biolot», Россия) в условиях насыщенной влажности в CO_2-инкубаторе с 5% CO_2 при 37°С. Замену культуральной среды осуществляли один раз в 3 сут. В процессе субкультивирования клеточную культуру в виде монослоя пересевали в плотности от 1000 до 5000 клеток/см^2 (это зависело от ростовых свойств применяемой эмбриональной сыворотки), применяли растворы Версена и трипсина в стандартных концентрациях.

С помощью световой и люминесцентной микроскопии, а также цитологическими методами было подтверждено, что культивируемые костномозговые клетки: имеют поверхностные антигены CD105+, CD90+, CD45-, CD34- (Coipeau P. et al., 2009; Martins A.A. et al., 2009; Berner A. et al., 2010); во время культивирования in vitro адгезируются к поверхности пластика; на протяжении всего времени культивирования остаются фибробластоподобными; не меняются в процессе культивирования на протяжении нескольких генераций; образуют колонии фибробластоподобных клеточных элементов при низкой плотности в начале культивировании. В экспериментах применяли клетки 2 – 3-й генераций.

Аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения 2-й или 3-й генерации, выделенные от крыс вышеуказанной инбредной линии, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., USA), имеющей в своем геноме участок с ДНК зеленого флюоресцентного протеина GFP. Трансфекция проходила под контролем промотора цитомегаловируса. Также внедряли ДНК, отвечающую за устойчивость к неомицину под контролем промотора вируса SV40, что является обязательным для дальнейшего отбора с применением дженетицина G418 (pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc., USA). Трансфекцию осуществляли с использованием трансфекционного реагента TurboFect, в соответствии рекомендациям производителя (Fermentas life sciences, Inc, Canada), использовали методику для трансфекции клеток в суспензии. Для процедуры содержание клеточных элементов составляло 1x10^6 в 1 мл взвеси, 4 мкг ДНК плазмиды и 10 мкл трансфекционного реагента TurboFect. Спустя 4 ч после процедуры клетки разбавляли интактными клетками в пропорции 1:2,5, после чего использовали для введения крысам в эксперименте.

Функционирование введенной ДНК GFP в МСК определяли, используя люминесцентную микроскопию, непосредственно изучали культуру клеток или считали светящиеся клетки в камере Горяева спустя 2 сут после трансфекции. Эффективность процедуры оценивали как процент флюоресцирующих клеточных элементов по отношению ко всем клеткам в поле зрения или камере Горяева. Среднее содержание трансфицированных клеток в готовой для введения культуре было около 3%.

В соответствии с рекомендациями о том, что двойная метка позволяет более точно идентифицировать МСК и структуры, сформированные из них в организме (Майбородин И.В. и др., 2012, 2013, 2015), клеточные мембраны этих клеток после трансфекции белка GFP дополнительно окрашивали раствором Vybrant® CM-Dil (Thermo Fisher Scientific, USA), который является карбоциановым красителем с максимумом флюоресцентного свечения в условиях применения родаминового фильтра при воздействии ультрафиолетовым светом с длиной волны 553 – 570 нм. Vybrant® CM-DiI – готовый раствор, при добавлении

в среду культивирования клеток окрашивает мембраны живых суспензионных или прикрепившихся клеток, используется при изучении слияния, адгезии и миграции клеток.

Через 2 ч после процедуры трансфекции плазмидной ДНК белка GFP к суспензии МСК добавляли краситель Vybrant® CM-DiI из расчета 5 мкл раствора на $1x10^6$ клеток в 1 мл среды без сыворотки, мягко тщательно перемешивали пипетированием и оставляли на 20 мин в CO_2-инкубаторе при 37°С в условиях насыщенной влажности. Затем МСК центрифугировали 5 мин при 1500 об./мин, среду с красителем удаляли, к клеткам добавляли новую порцию теплой среды. Данную процедуру удаления красителя проводили 3 раза. Затем МСК ресуспендировали в теплой среде из расчета $1x10^6$ клеток в 1 мл.

Методы морфологического анализа. Образцы лигированной вены с окружающими тканями и регионарные (паховые) ЛУ фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 ч, обезвоживали в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в гистопласт. Срезы толщиной 5 – 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки количества и распределения макрофагов на срезах проводили непрямую иммунопероксидазную реакцию с моноклональными антителами против CD68-антигена. Срезы изучали в световом микроскопе Axioimager M1 (Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз.

Неокрашенные срезы исследовали в режиме люминесценции указанного микроскопа с фильтрами Alexa 488 или для родамина, использовали также конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 780 NLO (Zeiss) на базе микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss).

Морфометрический анализ. Количественный анализ структурной организации ЛУ, их цитоархитектоники, подсчет количества мелких и средних сосудов (площадь просвета до 250 $мкм^2$) в единице площади среза проводили на фотографиях, сделанных с помощью цифровой камеры, с применением комплекса программ для морфометрии Axiovision (Zeiss, Германия). Использовали увеличения: х5 – тестовая площадь равна $5,6x10^6$ $мкм^2$ (стороны 2800х2000 мкм), х10 – тестовая площадь равно $1,4x10^5$ $мкм^2$ (стороны 1400х1000 мкм), х20 – тестовая площадь равна $3,5x10^5$ $мкм^2$ (стороны 700х500 мкм). При подсчете цитограммы (объектив х40) – тестовая площадь была равна $8,7x10^4$ $мкм^2$ (стороны 350х250 мкм) на каждом препарате анализировали до 5 неперекрывающихся участков срезов. Типы клеточных элементов верифицировали в соответствии с рекомендациями М.Г.Абрамова (1985), Ю.И.Бородина и В.Н.Григорьева (1986). Дифференцирование кровеносных и лимфатических сосудов в клетчатке проводили в соответствии с рекомендациями J. Casley-Smith (1973, 1983, 1987), J.R. Head, L.L. Seeling (1984) и В.И. Козлова и соавт. (1994).

Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием программы MS Excel 7.0 (Microsoft, USA); вычиляли среднее арифметическое и его ошибку. Статистическую значимость отличий сравниваемых данных проводили с использованием критерия Стьюдента (p) (Плохинский Н.А., 1970). Статистически значимым считали различия между сравниваемыми величинами при $p \leq 0,05$. В процессе расчетов было определено, что распределение изучаемых данных было нормальным или близким к таковому.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологический анализ тканей региона бедренной вены у интактных животных при исследовании методом люминесцентной микроскопии. В оболочках сосудов и тканях вокруг бедренной вены светящихся объектов найдено не было за исключением единичных макрофагов и эритроцитов в просвете сосудов. Эти клетки обладают аутофлюоресценцией (Davis R.W. et al., 2010; Wu X. et al., 2010; Campo J.J. et al., 2011; Watson J., 2011; Li F. et al., 2012; Duan M. et al., 2012) и могут светиться при воздействии ультрафиолетовым светом.

В корковом веществе паховых ЛУ у большинства животных светящиеся объекты полностью отсутствовали, даже в проекции лимфоидных узелков; всего в 2 случаях в корковом веществе были найдены небольшие бесформенные скопления очень крупных флюоресцирующих объектов. При внимательном изучении было обнаружено, что в таких объектах светятся мелкие включения. На соответствующих участках срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, лимфоидных узелков не было, но присутствовали макрофаги, иногда очень крупные. По-видимому, такие светящиеся объекты являются макрофагами с аутофлюоресценцией или светящимся фагоцитированным материалом в лизосомах (Luhmann U.F. et al., 2009; Iida T., 2011; Lei L. et al., 2012).

В мозговом веществе всех органов было множество светящихся объектов различных форм и размеров. На основании того, что при окраске гематоксилином и эозином в просвете мозговых синусов было обнаружено множество макрофагов и эритроцитов, расположенных свободно, можно предположить аутофлюоресценцию тех и других клеток при воздействии ультрафиолетовым светом. В стенке сосудов капсулы и паранодальной соединительной ткани флюоресцирующих объектов не выявлено, но рядом с сосудами светились единичные макрофаги, а в сосудистом просвете – эритроциты.

Патоморфология репаративных процессов в тканевом регионе перевязанной вены без коррекции. Через 4 сут после операции магистральная вена была со спавшимся небольшим просветом. Часто просвет был сужен настолько, что можно было говорить о частичной или даже полной облитерации. Иногда в магистральных сосудах присутствовали признаки тромбоза. В нормальных условиях отток крови от тканей осуществляется по магистральным венам, кроме того имеется значительная сеть венозных сосудов различного размера. При перевязке даже магистральной вены эта венозная сеть компенсирует отток крови и постепенно одна или несколько таких вен реорганизуется в новый магистральный ствол.

Лигирование крупной вены ведет к застою крови в тканях, повышению венозного давления дистальнее перевязки (Бородин Ю.И., Григорьев В.Н., 1986) и формированию кровоизлияний. Наблюдаемые геморрагии в тканях могут быть следствием лигирования магистральной вены и нарушения оттока крови.

В корковом веществе паховых ЛУ в большинстве наблюдений выявлены многочисленные расположенные поодиночке светящиеся объекты разного размера (не больше 10 мкм). При изучении при большом увеличении было найдено, что в некоторых случаях в таких флюоресцирующих клетках светятся включения. Эти светящиеся клетки были идентифицированы нами как макрофаги, поскольку в соответствующих участках ЛУ при окраске гематоксилином и эозином присутствовало много макрофагов. Свечение макрофагов за счет фагоцитированного материала достаточно широко описано в литературе (Luhmann U.F. et al., 2009; Iida T., 2011; Lei L. et al., 2012).

В мозговом веществе паховых ЛУ во всех случаях светилось множество объектов размером от 15 мкм до очень мелких, пылевидных, расположенных в мякотных тяжах и мозговых синусах. Наиболее вероятно, что крупные флюоресцирующие объекты были макрофагами с фагоцитированным светящимся материалом (эритроцитами, сидерином и детритом), а мелкие и пылевидные тем детритом, расположенным в просвете синусов и паренхиме мякотных тяжей. Поступление большого объема детрита, эритроцитов и продуктов их распада из региона лимфосбора возможно вследствие наличия там обширных геморрагий и поврежденных тканей, образовавшихся после операции и моделирования венозной непроходимости.

Через 1 нед после операции сосудисто-нервный пучок был заключен в широкий массив плотной волокнистой соединительной ткани. Магистральная вена имела признаки повреждения и тромбоза. Более мелкие сосуды всех типов были повреждены в меньшей степени, иногда в венах наблюдали сохранность клапанных структур. Лимфатические сосуды преимущественно были пустыми или содержали гомогенное слабоэзинофильно окрашен-

ное содержимое. На некоторых участках еще сохранились типичные сосуды грануляционной ткани, скорее всего, развившиеся на месте поврежденных при хирургическом вмешательстве тканей. Следует отметить наличие обширных свежих геморрагий, которые сформировались вследствие разрушения, инволюции грануляционной ткани или из-за разрушения стенки лигированной вены. Свечение сосудистых оболочек и отдельных клеток в них не выявлено ни в каких-либо исследованных сосудах.

В корковом веществе паховых ЛУ у всех животных не было обнаружено кольцевых структур из крупных светящихся клеток. В некоторых случаях паренхима ЛУ была пропитана форменными элементами крови, но эти участки геморрагий светились только незначительно ярче фона. В мозговом веществе у всех крыс присутствовало небольшое число объектов разных размеров и форм с яркой флюоресценцией. Эти светящиеся объекты отнесены к макрофагам, а их свечение связано с аутофлюоресценцией (Davis R.W. et al., 2010; Li F. et al., 2012; Duan M. et al., 2012) или с фагоцитированными эритроцитами и гемосидерином (Mitchell A.J. et al., 2010; Potter K.A. et al., 2012).

Через 2 нед после операции вокруг сосудисто-нервного пучка на очень значительном протяжении были найдены разрастания плотной волокнистой соединительной ткани, является результатом перенесенного хирургического вмешательства и лигирования магистральной вены. Бедренная вена имела толстые стенки и явно суженный просвет. Возможно, что это была одна из коллатеральных вен, оставшихся в ткани рубца, которая постепенно расширилась и компенсировала функцию лигированного сосуда. При исследовании образцов в люминесцентном режиме микроскопа установлено, что значительно ярче фона светились только эритроциты в сосудах и вне их, а также многочисленные макрофаги.

В паховых ЛУ в большинстве наблюдений выявлены разных размеров свежие и старые геморрагии с сидерофагами. Наиболее вероятно, что основной причиной появления геморрагий в узлах были микроциркуляторные расстройства, сопровождавшие асептическое воспаление в поврежденных при хирургическом вмешательстве и лигировании вены тканях. Биологически активные вещества, образовавшиеся в тканях, поступают в регионарные ЛУ с током лимфы, и там также вызывают нарушения микроциркуляции. При исследовании неокрашенных срезов в люминесцентном режиме микроскопа в корковом веществе ЛУ чаще всего встречались единичные крупные ярко флюоресцирующие объекты, несколько реже – скопления таких объектов: от мелких и бесформенных до крупных.

Через 3 нед после операции вокруг сосудисто-нервного пучка было отмечено развитие плотной волокнистой соединительной ткани. Рядом с артерией присутствовала одна крупная вена и несколько более мелких или в некоторых наблюдениях примерно одинаковых вен. После перевязки магистральной вены рядом расположенные коллатеральные вены компенсируют венозную недостаточность. В некоторых случаях один из коллатеральных сосудов постепенно становится крупнее и замещает выключенную из кровообращения и облитерированную бедренную вену. В других случаях сразу несколько коллатералей становятся крупнее, постепенно реорганизуются и замещают магистральный сосуд, меняя тип венозного оттока крови с магистрального на рассыпной.

В лимфоидной паренхиме пахового ЛУ были обнаружены различные по размерам кровоизлияния. Такие геморрагии иногда были очень обширными, в этих случаях наблюдали большое содержание эритроцитов в просвете синусной системы, иногда даже можно было говорить о блокаде синусов форменными элементами крови. Всегда рядом со скоплениями эритроцитов были расположены сидерофаги. Наиболее вероятной причиной формирования кровоизлияний было воспаление рядом с перевязанной веной. В корковом веществе ЛУ были расположены хорошо различимые лимфоидные узелки с центрами и без центров размножения, в этих структурах присутствовали крупные макрофаги. Однако была отмечена аутофлюоресценция только единичных эритроцитов, расположенных в просвете внутриузловых сосудов, скопления крупных светящихся клеток не выявлены, даже на участках паренхимы, соответствующих лимфоидным узелкам.

Через 4 нед после операции вблизи магистральных сосудов отмечено разрастание соединительной ткани, в которой находились сосуды венозного типа: в одних случаях – несколько практически одинаковых сосудов, в других – один сосуд был крупнее, остальные меньшего диаметра, возможно, образовавшиеся из мелких коллатералей. Лигированная вена была полностью облитерирована и замещена плотной волокнистой соединительной тканью. В просвете сосудов флюоресцировали эритроциты, а в соединительной ткани как вокруг сосудов, так и на месте облитерированной вены светились единичные крупные клетки – макрофаги.

В корковом веществе паховых ЛУ присутствовали светящиеся клетки, в основном расположенные поодиночке. Небольшие группы таких объектов были найдены в структурах лимфоидных узелков, но клетки не образовывали четких скоплений, не выстраивались по периферии узелков, их размер не превышал 10 мкм. Следует отметить, что в цитограмме узелков присутствовали крупные макрофаги с детритом в цитоплазме. Такая флюоресценция клеток в проекции лимфоидных узелков может быть обусловлена продолжающейся реорганизацией соединительной ткани в регионе лимфосбора (в области перевязанной вены).

Через 5 нед после операции вокруг магистральных сосудов наблюдалось разрастание волокнистой соединительной ткани, местами плотной, местами – рыхлой с большим числом очень мелких сосудов, возможно, остатков сосудов грануляционной ткани, рядом с которыми присутствовали макрофаги. Не исключено, что идет реорганизация послеоперационного рубца в рыхлую соединительную и жировую ткани, которые обычно расположены в области сосудисто-нервного пучка. В клетчатке или плотной соединительной ткани было расположено несколько сосудов венозного типа, которые по-видимому, образовались вследствие расширения и реорганизации нескольких коллатеральных вен, расположенных рядом с лигированной веной. В структурах вокруг магистральных сосудов, а также в послеоперационном рубце и мышечном массиве бедра флюоресцировали форменные элементы крови, находившиеся в сосудах, а также расположенные периваскулярно поодиночке крупные макрофаги.

В корковом веществе паховых ЛУ были найдены только расположенные поодиночке клетки флюоресценцией, которые имели разную интенсивность свечения, разные формы и размеры (от очень больших до мелких, практически пылевидных). Крайне редко клетки с флюоресценцией были расположены в местах, соответствующих лимфоидным узелкам. На окрашенных гематоксилином и эозином срезах в лимфоидной паренхиме коркового вещества содержались группы очень крупных макрофагов с хорошо различимым детритом в цитоплазме. В мозговом веществе ЛУ также были обнаружены одиночные светящиеся клетки разных размеров и форм. Следует отметить, что просвет мозговых синусов в некоторых случаях был практически блокирован клетками, среди которых было много макрофагов.

Патоморфология репаративных процессов в регионе бедренной вены в условиях введения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток без изменения кровотока. Через 4 сут после операции патологических изменений магистральных сосудов не обнаружено. Лимфатическое русло характеризовалось тонкими стенками и пустым просветом. Следует отметить флюоресценцию эритроцитов в мелких сосудах и единичных макрофагов в клетчатке и мышечной ткани бедра, что было обусловлено аутофлюоресценцией этих объектов (Watson J., 2011; Li F. et al., 2012; Duan M. et al., 2012). На ограниченных участках подкожной жировой клетчатки присутствовали единичные овальные или вытянутые (фибробластоподобные) ярко светящиеся клетки, которые были введенными аутологичными мультипотентными МСК костномозгового происхождения или макрофагами с детритом из этих клеток. Погибшие аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения и их детрит поглощаются тканевыми макрофагами и за счет фагоцитоза флюоресцентного белка GFP макрофаги сами приобретают или усиливают способность к свечению при воздействии ультрафиолетовым светом (Майбородин И.В. и др., 2016).

В корковом и мозговом веществе паховых ЛУ после введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения флюоресцировали ярче фона только единичные крупные клетки, в том числе в проекции лимфоидных узелков. При окраске гематоксилином и эозином выявлены многочисленные эритроциты как в паренхиме коркового вещества, так и в синусной системе мозгового вещества. Можно предположить, что введенные аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения на фоне неизмененного крово- и лимфотока быстро элиминируются из места инъекции. Не исключено, что эти клетки попадают в большом количестве в регионарные ЛУ и за счет вырабатываемых ими цитокинов или факторов культуральной среды вызывают повреждение внутриузловых кровеносных сосудов, что обусловливает появление эритроцитов в различных структурах регионарных ЛУ. Возможно также, что введение в ткани с неизмененной микроциркуляцией аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения способствует их попаданию в сосудистое русло (кровеносное и лимфатическое) и быстрому распространению по всему организму.

Через 1 нед после операции рядом с веной и вдали от нее в клетчатке и послеоперационном рубце у большинства крыс светящиеся объекты в стенке как кровеносных, так и лимфатических сосудов отсутствовали, за исключением аутофлюоресценции единичных макрофагов и эритроцитов. Вместе с этим были выявлены единичные случаи свечения клеток в сосудах послеоперационной грануляционной ткани или в плотной волокнистой ткани послеоперационного рубца. В одних участках ярко флюоресцировали многочисленные макрофаги рядом с сосудами, в других – было отмечено свечение только отдельных клеток в сосудистой стенке, иногда интенсивно люминесцировали макрофаги и клетки в оболочках сосудов. В условиях применения фильтра для родамина регистрировалось интенсивное свечение многочисленных мелких включений в таких клетках. Можно заключить, что введенные в область хирургического вмешательства аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения частично принимают участие в формировании послеоперационной грануляционной ткани, как это было описано ранее описано при других условиях применения клеточных технологий (Майбородин И.В. и др., 2012, 2013, 2015; Maiborodin I. et al., 2015), а частично вместе с детритом поглощаются макрофагами (Майбородин И.В. и др., 2014, 2016).

Полученные результаты позволяют также заключить, что макрофаги, фагоцитировавшие МСК с ДНК белка GFP и с окрашенными Vybrant® CM-DiI мембранами, приобретают способность к флюоресценции при облучении ультрафиолетовым светом за счет находящихся в лизосомах люминесцентных веществ. При использовании фильтра Alexa 488 регистрируется зеленое свечение, обусловленное белком GFP. В условиях применения фильтра для родамина возбуждается желтое или красное свечение из-за окрашенных мембран фагоцитированных МСК или их детрита. Введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения экономит время на пролиферацию и миграцию эндогенных клеток, грануляционная ткань в области поврежденных тканей в этих условиях формируется раньше. Ткани раньше освобождаются от детрита из погибших клеток, раньше начинаются репаративные процессы и раньше происходит рубцевание в области хирургического вмешательства.

В паховых ЛУ ни в одном случае не выявлено скоплений светящихся крупных клеток в корковом веществе. Крупные клетки с флюоресценцией были расположены поодиночке без какой-либо привязки к лимфоидным узелкам.

Через 2 нед после операции магистральные сосуды были окружены разными по толщине массивами плотной волокнистой соединительной ткани. В этом рубце со слабой интенсивностью флюоресцировали единичные макрофаги, свечение было незначительно ярче фона. Присутствие макрофагов подтверждено иммуногистохимическим окрашиванием с использованием моноклональных антител к антигену CD68. Иногда в клетчатке по краю сосудисто-нервного пучка были расположены единичные очень крупные CD68-

позитивные клетки размерами более 20 мкм. Эти клетки практически не флюоресцировали при использовании фильтра Alexa 488, но ярко светились в условиях применения фильтра для родамина.

Не исключено, что при макрофагальном лизисе аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения ДНК белка GFP и сам этот протеин быстро деградируют, а мембранный краситель или не разрушается ферментами лизосом или разрушается очень медленно. В результате происходит накопление этого красителя в макрофагах. Возможно, что Vybrant-CM-Dil не просто накапливается в макрофагах, а также окрашивает и их мембраны. Таким образом макрофаги приобретают способность к флюоресценции при облучении их ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина.

В корковом и мозговом веществе паховых ЛУ выявлены разные по размерам свежие геморрагии. Появление геморрагий может быть обусловлено действием МСК, поскольку они формируют в месте введения грануляционную ткань, при инволюции которой возможно попадание форменных элементов крови в ткани, и далее – в регионарные ЛУ. В корковом веществе паховых ЛУ у большинства животных присутствовали разные по размерам овальные скопления из крупных флюоресцирующих клеток, расположенные в участках лимфоидной паренхимы, соответствующих лимфоидным узелкам. Некоторые из таких скоплений клеток со свечением и, соответственно, лимфоидных узелков, были расположены непосредственно в участках кровоизлияний. Следует отметить присутствие макрофагов, часто с детритом в цитоплазме, в клеточном составе этих узелков, что хорошо видно на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. При использовании иммуногистохимической окраски для выявления макрофагального антигена CD68 эти фагоциты чаще выявлялись на периферии, чем в центре лимфоидных узелков.

Имунногистохимическое окрашивание с использованием антител к антигену CD68 показало наличие большого числа макрофагов в структурах мозгового вещества. Численность этих клеток соответствовала таковой на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и светящихся клеточных элементов на неокрашенных срезах при изучении их в люминесцентном режиме микроскопа.

В процессе изучения сосудов, расположенных в капсуле и паранодальной клетчатке паховых ЛУ, не выявлено заметной флюоресценции, превышающей фоновые значения. Вместе с этим, в ряде случаев макрофаги, расположенные периваскулярно, значительно более ярко флюоресцировали при использовании родаминового фильтра. Возможно, что аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения и их детрит частично попадают в кровеносное и лимфатическое русло. Таким образом возможно распределение этих клеток по всему организму и их попадание в регионарные паховые ЛУ. Во время нахождения в сосудистом русле, особенно в микроциркуляторных отделах, возможно захватывание периваскулярными макрофагами антигенных веществ из просвета сосудов, в том числе аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения и их окрашенного детрита.

Через 3 нед после операции сосудисто-нервный пучок бедра был заключен в массив плотной волокнистой соединительной ткани с мелкими сосудами, возможно, остатками грануляционной ткани. При изучении срезов в люминесцентном режиме микроскопа были найдены небольшие группы расширенных капилляров со слабым свечением только при использовании фильтра Alexa 488. В некоторых случаях рядом с такими сосудами располагались крупные клетки с очень яркой флюоресценцией при установке фильтра для родамина. В таких клетках флюоресцировало разное количество очень мелких круглых включений, от единичных до занимающих практически всю цитоплазму. Возможно, что такие сосуды со слабым свечением являются остатками структур, построенных с участием введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения со светящимся белком GFP. Инъецированные МСК постепенно замещаются собственными клетками организма, но, учитывая наличие слабого зеленого свечения, можно заключить,

что к этому времени еще не все инъецированные клетки были элиминированы из оболочек новообразованных сосудов.

Фагоцитоз макрофагами вытесняемых клеток с измененной ДНК или отличных по каким-то другим признакам клеточных элементов способствует накоплению в фагоцитах мембранного красителя, примененного для дополнительного мечения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. То, что макрофаги с красной флюоресценцией расположены рядом со светящимися сосудоподобными структурами, может указывать на участие макрофагов в элиминации введенных МСК или клеток, образовавшихся из них в результате дифференцировки, с лизисом фагоцитированных объектов.

В цитоплазме клеток рядом с сосудами мышечной ткани бедра было обнаружено четкое красное свечение. В данном случае существует вероятность поглощения макрофагами аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения или их детрита из кровотока. Фагоциты за счет мембранного красителя МСК приобретали способность к флюоресценции в условиях применения родаминового фильтра.

В большинстве наблюдений не было найдено скоплений крупных светящихся клеток в корковом веществе паховых ЛУ, хотя на окрашенных срезах визуализировались лимфоидные узелки с герминативными центрами, в которых присутствовали макрофаги с детритом. Выявлялись также различные по размерам геморрагии. Одной из основных причин формирования геморрагий в ЛУ является воспалительный процесс в регионе лимфосбора, инициированный введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, которые секретируют провоспалительные цитокины, вызывающие сосудистые нарушения.

Только в двух случаях в паховых ЛУ содержались овальные скопления крупных светящихся клеток на участках паренхимы, соответствующих расположению лимфоидных узелков. Цитоплазма этих клеток светилась неравномерно, в ней были заметны разные по размерам включения, иногда было видно более темное ядро. Некоторые такие объекты в условиях применения фильтра для родамина полностью светились намного интенсивнее, в других более ярко светились отдельные мелкие включения. Это доказывает возможность поступления введенных в ткани аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения или их детрита в регионарные ЛУ. Такая миграция не исключена как самостоятельный процесс вместе с током лимфы с дальнейшим фагоцитозом данных объектов макрофагами. Также возможно поглощения МСК вместе с детритом фагоцитами непосредственно в тканях в месте инъекции и миграция уже способных к флюоресценции макрофагов в ЛУ.

Через 4 нед после операции в некоторых случаях были отмечены обширные разрастания плотной волокнистой соединительной ткани в области послеоперационного рубца и вокруг магистральных сосудов. Возле небольших групп сосудов было отмечено свечение крупных клеток различной формы. В таких объектах выявлялась значительно более яркая флюоресценция включений разного размера при использовании родаминового фильтра. Наиболее вероятно, что эти крупные клетки со светящимися включениями являются макрофагами. Периваскулярное расположение меченных таким образом фагоцитов может косвенно свидетельствовать об их участии в элиминации клеток сосудистой стенки, образованных при дифференцировке аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, в процессе их замещения эндогенными клетками.

Необходимо обратить внимание, что в некоторых случаях яркая флюоресценция в условиях применения фильтра для родамина была обнаружена в вытянутых клетках, расположенных вдоль наружной или внутренней сосудистых оболочек. Возможно, что эти клетки – эндотелиоциты и перициты, образованные из введенных МСК, что показано в ряде работ, подтверждающих возможность дифференцировки аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения как в эндотелиоцитарном, так и в перицитарном направлениях (Майбородин И.В. и др., 2010, 2011; Maiborodin I. et al., 2011).

В мышечной ткани бедра на фоне незначительного отека регистрировалась интенсивная флюоресценция отдельных клеток разной формы рядом с сосудами и капиллярами. При изучении этих светящихся объектов с использованием различных фильтров выявлена очень яркая флюоресценция многочисленных цитоплазменных включений в условиях применения фильтра для родамина. В данном случае, наиболее вероятно, флюоресцируют периваскулярные макрофаги, фагоцитировавшие окрашенные мембранным красителем МСК, их детрит, и структуры, сформированные из этих клеток.

В корковом веществе паховых ЛУ присутствовали лимфоидные узелки с широким центром размножения. В люминесцентном режиме микроскопа в проекции узелков были найдены широкие овальные скопления ярко светящихся клеток как с выстраиванием части клеток по периферии узелка, так и в виде бесформенных образований. В отдельных крупных клетках была обнаружена очень интенсивная флюоресценция включений при применении родаминового фильтра. На окрашенных гематоксилином и эозином узелках всегда присутствовали очень большие макрофаги, часто с хорошо различимыми включениями в цитоплазме.

Это может служить доказательством того, что макрофаги с окрашенными мембранным красителем структурами могут присутствовать в лимфоидных узелках, по крайней мере, паховых ЛУ, где происходит активация, пролиферация и дифференцировка иммунокомпетентных клеток В-линии. Макрофаги могли получить Vybrant-CM-Dil только при фагоцитозе аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с окрашенными мембранами, их детрита или клеток и структур, сформированных из этих МСК.

В мозговом веществе паховых ЛУ выявлено множество расположенных по отдельности светящихся объектов разных форм и размеров. Необходимо отметить значительное число макрофагов в синусах. Во многих наблюдениях в разных клетках на фоне темного ядра наблюдалась очень интенсивная флюоресценция включений при применении родаминового фильтра. Иногда одна часть включений светилась только при применении фильтра Alexa 488, тогда как другая – только при установке фильтра для родамина. В структурах мозгового вещества паховых ЛУ всегда присутствовали многочисленные макрофаги, осуществляющие фагоцитоз чужеродных веществ, прошедших мимо иммунокомпетентных клеток, содержащихся в промежуточных синусах.

В паранодальных тканях и капсуле паховых ЛУ в отдельных клетках возле сосудов было выявлено свечение мелких включений, более интенсивное при использовании родаминового фильтра. Можно предположить, что окрашенный мембранным красителем детрит аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, а, возможно, и сами эти клетки попадают в кровеносные и лимфатические сосуды и таким образом распространяются по всему организму. В процессе этого расположенные рядом с сосудом макрофаги фагоцитируют такой обладающий антигенными свойствами детрит, и лизис таких фагоцитов начинают флюоресцировать при использовании родаминового фильтра.

Через 5 нед после операции вокруг магистральных сосудов уменьшался объем плотной волокнистой соединительной ткани в результате реорганизации послеоперационного рубца с развитием более характерной для этой области рыхлой волокнистой соединительной и жировой тканей. Кроме эритроцитов в просвете сосудов, в соединительной ткани выявлялись единичные флюоресцирующие крупные клетки. Примерно в половине наблюдений в таких крупных клетках, являющихся макрофагами, при применении фильтра для родамина было отмечено очень яркое свечение части цитоплазмы или разнокалиберных включений. Эти макрофаги приобретали способность к такой флюоресценции в результате фагоцитоза окрашенных Vybrant-CM-Dil аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, их детрита и структур, сформированных из этих клеток. В мышечной ткани располагались крупные клетки разной формы с интенсивной флюоресценцией при применении родаминового фильтра.

В паховых ЛУ, в половине наблюдений, не выявлено овальных скоплений крупных светящихся клеток (макрофагов), хотя в корковом веществе ЛУ были четко видны лимфоидные узелки даже на неокрашенных срезах. В остальных случаях на соответствующих лимфоидным узелкам участках паренхимы были найдены овальные скопления крупных светящихся клеток разных форм. В таких макрофагах интенсивно флюоресцировали многочисленные включения, часто было заметно более темное ядро.

В регионе лимфосбора паховых ЛУ в данный срок уже практически отсутствовали структуры, образованные введенными аутологичными мультипотентными МСК костномозгового происхождения. Фагоциты в основном не содержали включений, окрашенных мембранным красителем. Скорее всего, в этих случаях флюоресценция фагоцитов связана с какой-то их активацией или с поглощением эритроцитов из участков геморрагий.

В мозговом веществе паховых ЛУ ярко светились многочисленные клетки, расположенные поодиночке. В большинстве случаев свечение этих макрофагов обусловлено аутофлюоресценцией. Однако в некоторых клетках мозгового вещества при применении фильтра для родамина было обнаружено интенсивное свечение отдельных включений разных размеров. Появление специфической флюоресценции в макрофагах мозгового вещества, по-видимому, обусловлено теми же возможными причинами, как и в фагоцитах лимфоидных узелков. Это – миграция макрофагов с окрашенным детритом или мембранами из региона лимфосбора или фагоцитоз окрашенных веществ из лимфы, находящейся в синусной системе мозгового вещества.

В капсуле узлов и паранодулярной клетчатке было отмечено свечение той или иной интенсивности отдельных крупных клеток. В некоторых таких макрофагах, расположенных периваскулярно, при использовании родаминового фильтра очень интенсивно флюоресцировали отдельные мелкие включения. То есть существует возможность попадания таким способом меченых аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения и их фрагментов в сосудистое русло и распространение их по всему организму с соответствующим окрашиванием макрофагов, содержащихся возле сосудов даже в отдаленных органах и тканях и принимающих участие в фагоцитозе подобных объектов из крови.

Патоморфология особенностей репаративных процессов в тканевом регионе лигированной вены при использовании клеточных технологий. Через 4 сут после операции бедренная вена была со спавшимся, практически пустым просветом. В соединительной ткани сосудистого пучка наблюдались свежие геморрагии. Перевязка вены при моделировании венозной непроходимости сопровождается венозной гипертензией (Бородин Ю.И., Григорьев В.Н., 1986), по крайней мере, до тех пор, пока не будет сформировано адекватное коллатеральное кровообращение через другие вены. В связи с этим в тканях в регионе перевязанной вены формируются свежие геморрагии. Свой вклад в этот процесс вносят поврежденные кровеносные сосуды как при хирургическом доступе к сосудистому пучку, так и при лигировании вены.

При изучении неокрашенных срезов в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром Alexa 488 отсутствовало специфическое свечение в стенке облитерированной вены. В большинстве случаев флюоресценция не была отмечена и в стенке мелких кровеносных и лимфатических сосудов. Только в одном случае было найдено свечение части стенки (эндотелия) сосуда, оболочка которого была представлена одним рядом клеток. В таких флюоресцирующих клетках ярко светилась цитоплазма, ядро было темным.

Иногда в соединительной ткани сосудистого пучка присутствовали единичные овальные достаточно крупные (10 – 15 мкм) клетки с очень ярким свечением цитоплазмы и более темным ядром. Наиболее вероятно, что эти клетки являются или введенными аутологичными мультипотентными МСК костномозгового происхождения, мигрировавшими активно или пассивно из места введения, или макрофагами, светящимися за счет фагоцитированного материала (Luhmann U.F. et al., 2009; Iida T., 2011; Lei L. et al., 2012):

GFP из разрушенных МСК или эритроциты (гемосидерин) из участков рассасывания геморрагий (Mitchell A.J. et al., 2010; Potter K.A. et al., 2012).

Следует отметить, что практически у всех животных в соединительной ткани сосудистого пучка обнаружены довольно большие скопления ярко флюоресцирующих удлиненных клеток. В некоторых случаях можно проследить начало формирования из таких клеток кольцеобразных структур, возможно, сосудов. На основании фибробластоподобной морфологии и яркой флюоресценции можно предположить, что эти светящиеся объекты являются введенными МСК в месте инъекции или недалеко от него.

На основании окрашивания мембран аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения красителем Vybrant-CM-Dil, флюоресцирующим красным цветом при облучении ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина, было проведено исследование с использованием конфокальной микроскопии. При совмещении изображений, полученных по каналам Alexa 488, «родамин» и «фазовый контраст» было обнаружено присутствие клеток с достаточно ярким красным свечением и разной морфологией (округлые, вытянутые фибробластоподобные, эндотелиоподобные), которые были расположены как в самой клетчатке, так и рядом с сосудами и непосредственно в их оболочках. То есть введенные аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения через 4 сут после инъекции не только сами полностью формировали сосуды, но одновременно и параллельно встраивались в сосуды, образующиеся из эндогенных клеток. Это также ускоряет васкуляризацию тканей с нарушенным кровообращением и в дальнейшем позволяет более быстро и с минимальными последствиями элиминировать пусть и генетически идентичные, но взятые у другой особи МСК, из структур, созданных с их участием.

В паховых ЛУ в большинстве наблюдений присутствовали единичные флюоресцирующие объекты различного размера, разбросанные по срезу всего органа и сосредоточенные, главным образом, в паракортикальной зоне и мозговом веществе. При одновременном изучении срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, и неокрашенных срезов в режиме люминесценции, установлено, что такие светящиеся объекты являются или макрофагами, часто очень крупными, или эритроцитами во внутриузловых сосудах, в паренхиме и в синусной системе (геморрагии в узлах).

При использовании конфокальной микроскопии в режиме каналов Alexa 488 и «родамин» было подтверждено, что эти крупные клетки в скоплениях светятся не целиком и равномерно, а содержат включения разного размера и окраски. То есть часть включений светилась зеленым цветом при применении канала Alexa 488, тогда как другие включения флюоресцировали красным при включении канала «родамин». Светящиеся клетки в паховых ЛУ являются макрофагами, которые фагоцитируют часть введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения непосредственно в тканях с дальнейшей миграцией в ЛУ или поглощают детрит погибших клеток и часть самих МСК уже в ЛУ.

Одновременное присутствие в макрофагах зеленых и красных включений при использовании соответствующих режимов конфокальной микроскопии также хорошо объясняется с этих позиций. Так как введенные аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения содержали не только белок GFP, но и краситель мембран, видимый при использовании родаминового фильтра, то при фагоцитозе этих клеток лизосомы фагоцитов светятся и зеленым цветом за счет белка GFP, и красным из-за присутствия Vybrant-CM-Dil.

Через 1 нед после операции сосудисто-нервный пучок был заключен в массив плотной волокнистой соединительной ткани. Стенки вены были склерозированными, ее просвет был разделен на несколько фрагментов и содержал небольшое количество форменных элементов крови. Развитие соединительной ткани вокруг сосудов обусловлено хирургическим вмешательством. Поврежденные ткани (разрез, стягивание лигатурами) посте-

пенно лизируются и замещаются сначала грануляционной и далее плотной волокнистой соединительной тканью. Оболочки вены после лигирования атрофируются и подвергаются склеротической трансформации, небольшие фрагменты просвета вены с эритроцитами отражают продолжающееся функционирование участков сосуда, по которым кровь из него поступает в коллатерали.

Отсутствие светящихся объектов в стенке лигированной вены и окружающих сосудов обусловлено тем, что восстановления кровотока по магистральной вены не происходит ни спонтанно, ни с участием введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Большой участок вены выключается из кровотока, и функции этого сосуда компенсируются коллатералями, которые существовали еще до момента операции и расширяются при увеличении тока крови через них.

Рядом с магистральными сосудами были расположены многочисленные лимфатические сосуды с тонкими стенками, очень широкими просветами, пустые или с небольшим объемом слабоокрашенного содержимого. При венозном застое и подъеме венозного давления лимфатическая система частично компенсирует отведение тканевой жидкости и жидкой части крови (Yamauchi Y. et al., 2002; Stewart R.H. et al., 2004, 2006), по крайней мере, до регионарных паховых ЛУ, где жидкая часть лимфы частично сбрасывается в кровеносное русло (Бородин Ю.И., Григорьев В.Н., 1986). Расширение лимфатического русла в регионе лигированной вены связанно именно с частичной компенсацией нарушенного венозного оттока.

В подкожной клетчатке и соединительной ткани в месте хирургического вмешательства присутствовали обширные скопления крупных клеток с яркой флюоресценцией, которые расположены как поодиночке, так и небольшими группами. Эти клетки светились не целиком, в них прослеживались ярко флюоресцирующие включения различных размеров и форм, в результате чего они были отнесены к макрофагам.

Кроме макрофагов, в клетчатке и послеоперационном рубце выявлялись ярко флюоресцирующие клетки, их группы, а также мелкие сосуды с оболочкой, состоящей из одного слоя клеток. Светящиеся клетки, расположенные поодиночке и небольшими группами, имели веретенообразную форму, практически гомогенно флюоресцировали при использовании ультрафиолетового света с фильтром Alexa 488. В некоторых клетках были обнаружены включения, ярко светящиеся в условиях применения родаминового фильтра. То есть можно заключить, что как одиночные клетки, так и их группы и даже целые сосуды, расположенные в подкожной клетчатке и плотной волокнистой соединительной ткани рубца после хирургического вмешательства, были введенными аутологичными мультипотентными МСК костномозгового происхождения или происходили из них в результате пролиферации и дифференцировки.

В макрофагах (крупных клетках с многочисленными разнокалиберными светящимися включениями) также возможно свечение при использовании фильтра для родамина. Макрофаги фагоцитируют часть введенных аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения и их детрит, и за счет присутствия в лизосомах фагоцитов окрашенных Vybrant-CM-Dil мембран МСК становится возможным флюоресценция макрофагов в таких условиях.

В корковом веществе паховых ЛУ иногда различались овальные скопления из крупных светящихся клеток, флюоресценция которых обеспечивалась свечением разнокалиберных включений. При окраске гематоксилином и эозином таким участкам соответствовали лимфоидные узелки, в которых было много макрофагов.

Через 2 нед после операции сосудисто-нервный магистральный пучок был заключен в массив плотной волокнистой соединительной ткани, где были обнаружены отдельные сосуды капиллярного типа со стенками, светящимися ярче фона. У более чем половины животных в оставшихся сосудах грануляционной ткани в рубце присутствовали единичные сосуды и их группы, в которых в рядом расположенных клетках, иногда очень много-

численных и занимающих практически все поле зрения, было отмечено четкое преобладание свечения на фоне использования фильтра для родамина. Эти клетки были достаточно крупными, имели неправильную форму, в них ярко флюоресцировали мелкие включения. Это были макрофаги, фагоцитировавшие введенные МСК и структуры, образованные с их участием.

В корковом веществе паховых ЛУ наблюдались геморрагии разных размеров с сидерофагами среди эритроцитов. После перевязки бедренной вены повышается венозное давление в окружающих тканях, и там образуются обширные геморрагии, формирование которых продолжается до полной компенсации кровотока коллатералями. Поэтому не исключено поступление из кровоизлияний в регионе перевязанной вены форменных элементов крови в регионарные паховые ЛУ, где продолжается фагоцитоз и лизис эритроцитов макрофагами. Вследствие инволюции грануляционной ткани, которая формировалась в месте операции, форменные элементы крови также могут оказываться в тканях, откуда и поступают в регионарные ЛУ. Кроме того, нельзя исключить формирование геморрагий в самих паховых ЛУ из-за нарушения целостности внутриузловых сосудов под действием поступающих из региона лимфосбора различных факторов, которые продуцируются как при асептическом воспалении, так и при разрушении, лизисе клеток, в том числе и инъецированных МСК.

При изучении неокрашенных срезов в люминесцентном режиме микроскопа в корковом веществе паховых ЛУ выявлены овальные скопления крупных клеток, но их флюоресценция была очень слабой, только незначительно ярче фона.

Через 3 нед после операции в месте хирургического вмешательства формировались широкие прослойки плотной волокнистой соединительной ткани, в которых присутствовали многочисленные мелкие тонкостенные сосуды и клетки, регистрировались обширные кровоизлияния. В участках геморрагий и рядом с ними за счет аутофлюоресценции светилось множество эритроцитов. Кроме того, очень ярко в кровоизлияниях светились крупные овальные клетки, по-видимому, сидерофаги. Также отмечена флюоресценция незначительно ярче фона в единичных тонкостенных капиллярах. При исследовании таких объектов с использованием разных фильтров в сосудистых оболочках не было обнаружено заметных различий результатов при применении фильтра для родамина или Alexa 488. Однако рядом с этими и другими сосудами были расположены многочисленные крупные клетки с мелкими включениями, значительно интенсивнее светящимися при использовании родаминового фильтра. Такие клетки являются макрофагами, в которых светятся мембраны или лизосомы с мембранным красителем из фагоцитированных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, их детрита или структур, построенных из них и подвергшихся инволюции. То, что такие макрофаги расположены периваскулярно, может указывать на участие МСК в формировании сосудов грануляционной ткани. Постепенно клетки в сосудах, дифференцировавшиеся из инъецированных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, замещаются эндогенными клетками.

В мышечной ткани очень часто выявлялось свечение отдельных клеток разных форм и размеров, как находившихся непосредственно в наружной оболочке сосудов, так и расположенных периваскулярно. Следует особо отметить более яркое свечение таких клеток (макрофагов) при использовании фильтра для родамина. Свечение в условиях установки родаминового фильтра макрофаги могли приобрести в результате фагоцитоза аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения и их детрита из просвета сосудов, куда они могли попасть из места введения в тканях, особенно учитывая нарушения микроциркуляции, повреждение сосудистых оболочек при воспалении и наличие обширных геморрагий.

В паховых ЛУ иногда присутствовали свежие геморрагии и всегда было много лимфоидных узелков с центрами и без центров размножения. Кровоизлияния в паховых ЛУ,

скорее всего, отражают изменения микроциркуляции в регионе лимфосбора, обусловленные хроническим воспалительным процессом, развившимся в ответ на операцию и введение генетически чужеродных МСК с ДНК белка GFP. Также возможно поступление эритроцитов в паховые ЛУ из тканей вокруг перевязанной вены, где также выявлены обширные геморрагии.

В расширенных лимфоидных узелках, где содержалось много макрофагов, были обнаружены многочисленные флюоресцирующие крупные клетки, расположенные в виде широких овальных скоплений. В этих клетках светились многочисленные включения, и оставалось темным ядро. Только в одном случае был найден большой объект неправильной формы с множеством цитоплазменных включений, ярко светящихся при установке родаминового фильтра. Несомненно, что свечение такой выраженной интенсивности при использовании фильтра для родамина может быть обеспечено только присутствием в данном объекте мембранного красителя Vybrant-CM-Dil.

В паранодулярной клетчатке в основном была зарегистрирована флюоресценция отдельных клеток. Довольно часто в таких клетках присутствовало небольшое количество очень мелких включений, более интенсивно светящихся при установке родаминового фильтра. Скорее всего, эти клетки являются макрофагами, на что указывает разнообразие их размеров и форм, а наличие включений с флюоресценцией при использовании родаминового фильтра связано с фагоцитозом аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, их детрита, мембранного красителя.

Через 4 нед после операции в области магистральных сосудов по-прежнему присутствовал обширный массив плотной волокнистой соединительной ткани. В этом рубце присутствовали многочисленные клетки, остатки перевязанной вены с облитерированным просветом и многочисленные сосуды венозного типа, а также лимфатические сосуды. Но в этот срок уже не было геморрагий. Наличие множества венозных сосудов при отсутствии кровоизлияний указывает на завершение реорганизации кровотока после лигирования и облитерации магистральной вены. Отток крови от тканей конечности вместо одного сосуда осуществлялся по нескольким более мелким венам.

В режиме люминесценции в рубце светились форменные элементы крови в сосудах и, более ярко, крупные овальные клетки, расположенные в соединительной ткани поодиночке. В большинстве таких клеток было отмечено сильное свечение многочисленных включений в условиях применения родаминового фильтра. Эти клетки были отнесены к макрофагам, в которых флюоресценция включений обусловлена мембранным красителем, попавшим при фагоцитозе аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения и их детрита. Кроме того, иногда были найдены тонкие вытянутые клетки, расположенные непосредственно в оболочках небольших сосудов рубца или вдоль них, также более ярко светящиеся при установке фильтра для родамина. Не исключено, что такие объекты являются клетками стенок сосудов, сформированных из введенных МСК при их дифференцировке.

В паховых ЛУ практически отсутствовали геморрагии, что было свидетельством их формирования вследствие тех же самых причин, что и в области лигированной магистральной вены после введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. В корковом веществе присутствовало много широких лимфоидных узелков как без центров размножения, так и с герминативными центрами. В этих центрах было много макрофагов, в которых часто содержался клеточный и тканевой детрит.

В большинстве паховых ЛУ содержались многочисленные обширные скопления крупных светящихся клеток в паренхиме коркового вещества, а именно в лимфоидных узелках. Клетки в таких скоплениях имели различные формы и размеры, а также разную интенсивность флюоресценции, в них светились мелкие включения. В данном случае обнаружение таких скоплений светящихся клеток, скорее всего, отражает активацию формирования (пролиферации и дифференцировки) иммунокомпетентных клеток в ЛУ. О реакции

на воспаление также свидетельствовали гипертрофия и гиперплазия лимфоидных узелков.

В мозговом веществе паховых ЛУ была отмечена разной интенсивности флюоресценция многочисленных единичных объектов разных размеров и форм. Следует отметить значительное содержание макрофагов в мозговом веществе и резкое снижение численности эритроцитов, что, наиболее вероятно, связано с рассасыванием и исчезновением геморрагий в тканях. В двух случаях во включениях в некоторых клетках было отмечено четкое и выраженное преобладание яркости свечения на фоне применения родаминового фильтра. Не исключено, что в этих случаях вследствие массивного попадания в ЛУ окрашенного мембранным красителем детрита, часть такого детрита проходит мимо фагоцитов, расположенных в промежуточных синусах коркового вещества. Далее антигены вместе с красителем попадают в мозговое вещество, где фагоцитируются макрофагами, содержащимися в мякотных тяжах и мозговых синусах. В результате этого макрофаги приобретают способность к люминесценции при облучении ультрафиолетовым светом при использовании фильтра для родамина.

Через 5 нед после операции в первую очередь в области магистральных сосудов обращали на себя внимание обширные разрастания плотной волокнистой соединительной ткани практически без сосудов и с малым числом клеток. В области сосудистого пучка была расположена или одна крупная вена (очень редко) или несколько сосудов венозного типа небольшого диаметра (намного чаще). Скорее всего, и одна вена и рассыпной тип венозного русла были сформированы в результате реорганизации существующих коллатералей после лигирования магистральной вены.

В значительно склерозированной подкожной клетчатке были обнаружены многочисленные расположенные поодиночке крупные клетки разных форм с очень интенсивной флюоресценцией при установке фильтра для родамина. Эти клетки были расположены как рядом с сосудами, так и вдали от них. Наиболее вероятно, что такие клеточные элементы являются макрофагами, которые приобрели способность к люминесценции после фагоцитоза аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с окрашенными мембранами. Вследствие того, что эти макрофаги находились поодиночке и вне скоплений таким же образом окрашенных клеток, можно заключить, что фагоциты после поглощения МСК, их детрита и приобретения способности к свечению могут мигрировать по соединительной ткани в достаточно удаленные от места инъекции участки.

В мышечной ткани выявлена флюоресценция только единичных клеток, расположенных по ходу сосудов. В таких клетках многочисленные мелкие включения светились незначительно интенсивнее в условиях применения родаминового фильтра. В данных случаях, скорее всего, светились макрофаги, которые приобрели способность к флюоресценции в результате фагоцитоза окрашенных Vybrant-CM-Dil аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения и их детрита из просвета сосудов.

В корковом веществе паховых ЛУ присутствовали небольшие свежие кровоизлияния. Геморрагии по расположению не совпадали со скоплениями крупных светящихся клеток. Это может указывать на то, что причиной флюоресценции макрофагов был не фагоцитоз эритроцитов из тканей. Более вероятно появление кровоизлияний непосредственно в самих ЛУ из-за выброса биологически активных веществ, выражено нарушающих микроциркуляцию и приводящих к повреждению сосудистых оболочек. Одной из таких возможных причин может быть массивная гибель клеток, тех же МСК, при элиминации структур, построенных из них, вследствие замещения в таких структурах МСК клетками организма-реципиента. Другой причиной могут быть очень активные иммунные процессы в паховых ЛУ в ответ на введение и массивную деструкцию аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения.

В некоторых паховых ЛУ скопления овальных светящихся клеток полностью отсутствовали, несмотря на наличие лимфоидных узелков без центров и с центрами размноже-

ния. Тогда как в корковом веществе других паховых ЛУ было много таких структур с флюоресцирующими клетками. Следует отметить, что на окрашенных гематоксилином и эозином срезах на периферии (чаще) и в центре (намного реже) лимфоидных узелков содержались очень крупные макрофаги с хорошо заметным детритом в цитоплазме. Учитывая отсутствие свечения клеток в скоплениях при изучении с родаминовым фильтром во всех срезах всех ЛУ, можно предположить, что такая интенсивная флюоресценция не всегда связана с фагоцитозом введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, а может быть обусловлена и другими причинами, например, активацией или поглощением способного к люминесценции детрита (Luhmann U.F. et al., 2009; Iida T., 2011; Lei L. et al., 2012).

В капсуле и паранодулярных тканях в отдельных клетках, расположенных рядом с сосудами, выявлена флюоресценция небольшого числа очень мелких включений, незначительно более интенсивная в условиях применения родаминового фильтра. Можно предположить, что детрит введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения при их деструкции или элиминации из различных структур, тех же сосудистых оболочек, частично попадает в кровеносное и лимфатическое русло, откуда возможно его поглощение периваскулярными макрофагами.

Сравнительный анализ морфологических изменений при экспериментальном тромбозе и лигировании вены. Нарушения венозного оттока происходят не только из-за локальных препятствий току крови, например, лигирования или ограниченного повреждения вены во время хирургических манипуляций и травм, но и вследствие тромбирования участка венозного русла. В связи с этим проведено сравнение основных морфологических изменений, характерных для острого локального нарушения венозного оттока и экспериментального флеботромбоза. Состояние тканей бедра интактных животных и крыс после лигирования бедренной вены без последующего применения клеточных технологий подробно представлено выше.

Через 4 сут после моделирования флеботромбоза непосредственно в самой вене сохранялись только остатки тромба, большая часть просвета такого сосуда была свободна. Фрагменты тромба на большом протяжении располагались на стенке сосуда (пристеночный тромбоз), были уже фрагментированы на более мелкие остатки и инфильтрированы крупными клетками, скорее всего, макрофагами. Вместе с этим формировались тромбы в мелких ветвях этой вены, проходивших в толще мышц бедра.

Через 1 нед в просвете магистрального сосуда тромб почти полностью лизирован, от него оставались только мелкие пристеночные фрагменты. В значительно склерозированной клетчатке были расположены лимфатические сосуды с широким просветом, многие из них имели толстые стенки с признаками склероза. Эозинофильно окрашенное содержимое лимфатических сосудов не было гомогенным, а с множеством уплотнений, «пустых» мест и перетяжек. В межфасцикулярных пространствах поперечно-полосатой мышечной ткани присутствовало множество кровеносных сосудов с облитерированным просветом, причем облитерация часто была полной. В мышечной ткани также присутствовали варикозно измененные сосуды. Лимфатические капилляры иногда имели тонкие стенки и расширенный просвет.

Через 2 нед проходимость большинства кровеносных сосудов была практически восстановлена, но присутствовали разные по размерам лимфатические сосуды и капилляры со склерозированными стенками и признаками лимфостаза и тромбоза (гетерогенное интенсивно окрашенное содержимое с клеточной инфильтрацией). В мышцах бедра присутствовали сосуды венозного типа в виде цепочек, что свидетельствовало об их варикозной извитости. Иногда в таких мелких сосудах, стенки которых были склеротически изменены, присутствовали остаточные явления тромбоза. В некоторых случаях сосуды с тромбом имели характерный для процесса реканализации вид: стенка сосуда утолщена, просвет выполнен гетерогенными массами с большими отверстиями, перетяжками между

ними и клеточной инфильтрацией.

Через 3-й нед выраженность склероза вокруг магистральных сосудов несколько уменьшилась, лимфатические сосуды не имели признаков тромбоза или лимфостаза. Некоторые кровеносные и лимфатические сосуды, расположенные в мышечном массиве бедра, были варикозно изменены, но остаточных явлений тромбоза в них уже не было. Однако по-прежнему иногда присутствовали облитерированные сосуды в прослойках соединительной ткани между пучками мышечных волокон.

Через 4 и 5 нед как после моделирования флеботромбоза, так и после лигирования вены в области сосудистого пучка были найдены только склеротические изменения.

Таким образом, при тромбозе поражается участок вены на большом протяжении вместе с коллатералями, более того, блокируется венозный отток даже по мелким сосудам. Причем тромбируются не только кровеносные, но и лимфатические сосуды. Нарушаются кровообращение и лимфоток из значительного объема тканей. Необходимо включение массивного ангиогенеза для восстановления микроциркуляции с развитием новых кровеносных и лимфатических сосудов, причем не только рядом с магистральной веной, но и во всем тканевом регионе. При лигировании вены непроходимость сосуда локальная, застой быстро компенсируется уже имеющимися коллатералями. Причем из-за компенсации нарушенного кровообращения нет значительной гипоксии, объем пораженных тканей значительно меньше. Не происходит значительных изменений лимфатической системы региона, были обнаружены только свидетельства компенсации ею недостаточности венозного оттока. Также не было отмечено тромбоза сосудов и последующего ангиогенеза в мышечной ткани. То есть при тромбозе быстро восстанавливается магистральный сосуд, но длительное время сохраняются нарушения микроциркуляции тканевого региона. При локальном препятствии венозному оттоку участок сосуда облитерируется, нарушения микроциркуляции кратковременны и происходят только рядом с лигатурой, в тканевом регионе изменений практически нет.

Морфометрический анализ микроциркуляторного русла и воспалительных реакций после использования клеточных технологий в регионе лигированной вены.

Выраженность лейкоцитарной инфильтрации. Через 4 сут у ложнооперированных крыс после введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения без изменений кровотока численная плотность всех лейкоцитов (95,3±8,78 клеток на 10^5 мкм^2 площади среза) и у крыс после применения этих клеток на фоне перевязанной вены (127±11,2 клеток) была меньше на 79,4 и 33,3%, соответственно, по сравнению с животными с лигированием вены без инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения (171±9,41 клеток).

Через 1 нед после моделирования острой венозной блокады без использования аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения лейкоцитов (127±5 клеток на 10^5 мкм^2 площади среза) было больше в 2,6 раза, чем у ложнооперированных крыс и животных после инъекции МСК в проекции лигированной вены. Спустя 2 нед после лигирования вены без применения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения лейкоцитов (89,7±5,84 клеток на единицу площади среза) было больше в 3,8 и 3,6 раза, соответственно, относительно ложнооперированных крыс и животных после инъекции МСК в проекции лигированной вены.

Через 3 нед после перевязывания вены без введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения лейкоцитов (40,1±5,36 клеток на 10^5 мкм^2 площади среза) было больше в 3,5 и 3,3 раза, соответственно, чем у ложнооперированных крыс и животных после инъекции МСК в проекции лигированной вены. Через 4 нед после наложения лигатуры на вену без инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения численная плотность лейкоцитов (15,4±2,36 клеток на 10^5 мкм^2 площади среза) была больше на 86 и 87,1%, соответственно, чем у ложнооперированнх крыс и животных после инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового

происхождения в проекции лигированной вены. Подобный характер выраженности лейкоцитарной инфильтрации сохранялся в экспериментальных группах животных сохранялся до конца опыта.

Через 1 нед после моделирования острой венозной блокады без использования аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения абсолютное число нейтрофилов (11,6±1,45 клеток на 10^5 мкм^2 площади среза) было больше в 5 и 4,8 раза, соответственно, чем у ложнооперированных крыс и животных после инъекции МСК в проекции лигированной вены. Во все остальные сроки статистически достоверные различия между сравниваемыми группами крыс обнаружены не были, но сохранялась тенденция к снижению выраженности нейтрофильной инфильтрации при применении аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения.

Изменения васкуляризации. При лигировании вены без введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения объемная плотность сосудов вблизи с лигированной бедренной вены через 1; 2; 3; 4 и 5 нед была статистически значимо больше на 42,7%; 61,4%; в 2,1; 2,3 раза и на 92,6%, соответственно, чем у интактных животных (табл. 1).

Таблица 1. Объемная плотность (в %) сосудов после лигирования вены (M±m)

Группы крыс	Время после инъекции АММСККП					
	4 сут	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед	5 нед
	1	2	3	4	5	6
	Вблизи лигированной вены					
Интактные	0,96±0,068					
Лигирование вены без АММСККП	1,0±0,03$^{2–6}$	1,36±0,08$^{*1,4–6}$	1,54±0,07$^{*1,4–6}$	1,93±0,07$^{*1–3}$	2,01±0,09$^{*1–3}$	1,84±0,08$^{*1–3}$
Ложнооперированные (инъекция АММСККП без блокады вены)	0,95±0,06$^{2–4}$	1,30±0,08^{*1,5,6}	1,2±0,07^{*1,5,6}	1,13±0,05^{*1,6}	0,97±0,08^{2,3}	0,92±0,08$^{2–4}$
Введение АММСККП через кожу в проекции лигированной вены	1,11±0,08$^{2–4}$	1,31±0,07$^{*1,4–6}$	1,42±0,05^{*1,5,6}	1,56±0,06^{*1,2,5,6}	1,09±0,07$^{2–4}$	1,12±0,05$^{*2–4}$
На участке разреза кожи						
Интактные	1±0,046					
Лигирование вены без АММСККП	1,22±0,07$^{2–6}$	1,41±0,07$^{*1,3–6}$	1,79±0,06$^{*1,2,4–6}$	2,74±0,07$^{*1–3,5,6}$	3,07±0,07$^{*1–4,6}$	2,19±0,07$^{*1–5}$
Ложнооперированные (введение АММСККП без блокады вены)	1,10±0,07^{2}	1,34±0,05$^{*1,3–6}$	1,11±0,05^{1}	1,09±0,08^{1}	0,99±0,08^{1}	0,93±0,08^{1}
Введение АММСККП в проекции лигированной вены	1,32±0,08^{4}	1,32±0,06^{*4,5}	1,46±0,05^{*4,5}	2,12±0,05$^{*1–3,5}$	1,03±0,07$^{2–4}$	1,12±0,87

Примечание. Здесь и в таблице № 2: АММСККП – аутологичные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костномозгового происхождения; $^{1, 2, 3, 4, 5, 6}$ – $p \leq 0,05$ при сравнении со значениями в указанных ячейках; * – $p \leq 0,05$ при сравнении с интактной группой.

У ложнооперированных крыс на фоне применения МСК без изменения венозного кровотока объемная плотность сосудов вблизи бедренной вены через 1; 2 и 3 нед стало больше на 36,4; 26 и 18,7%, соответственно, чем у интактных животных. Через 4 сут этот показатель был ниже на 37,6; 26,1 и 19,7%, соответственно, чем через 1; 2 и 3 нед. Объемная плотность мелких и средних сосудов через 1 нед была больше на 34,5 и 42,8%, соответственно, чем через 4 и 5 нед. Через 2 нед этот показатель был выше на 23,8 и 31,9%, соответственно, чем спустя 4 и 5 нед. Через 3 нед содержание сосудов было больше на 24,3%, чем через 5 нед (см. табл. 1). Объемная плотность сосудов возле бедренной вены после инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхож-

дения в проекции перевязанной вены через 1; 2; 3 и 5 нед была статистически значимо больше на 37,5; 48,9; 63,4 и 17,7%, соответственно, чем у интактных животных. Через 4 сут объемная плотность сосудов была ниже на 18; 27,8 и 40,3%, соответственно, чем через 1; 2 и 3 нед. Объемная плотность сосудов через 1 нед была значимо меньше на 19%, чем через 3 нед, но больше на 19,9 и 16,9%, соответственно, чем через 4 и 5 нед. Через 2 нед объемная плотность сосудов была выше на 29,9 и 26,6%, соответственно, чем спустя 4 и 5 нед. Через 3 нед объемная плотность сосудов была больше на 42,8 и 39%, соответственно, чем через 4 и 5 нед (см. табл. 1).

Спустя 2 нед у ложнооперированных крыс с введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения без изменений кровотока объемная плотность сосудов возле бедренной вены была меньше на 28,1 и 18,2%, соответственно, чем у животных после строй венозной блокады без использования и с использованием МСК в проекции лигированной вены.

Через 5 нед у ложнооперированных крыс с введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения без изменений кровотока объемная плотность сосудов возле магистральной вены была меньше в 2 раза и на 23,1%, соответственно, чем у животных после моделирования острой венозной блокады без использования МСК и после их инъекции в проекции лигированной вены. Объемная плотность сосудов при перевязке вены без использования МСК была больше на 63,7%, чем при блокаде вены с введением МСК.

При лигировании вены без введения МСК объемная плотность сосудов в месте ушивания раны через 1; 2; 3; 4 и 5 нед значимо возрастала на 40,7%; 78,3%; в 2,6; 2,9 и 2,1 раза, соответственно, относительно интактных животных. Через 4 сут объемная плотность сосудов была уменьшена на 15,5%; 46,4%; в 2,3; 2,6 раза и на 79%, соответственно, по сравнению с 1; 2; 3; 4 и 5 неделями. Объемная плотность сосудов через 1 нед была меньше на 26,9%; 93,8%; в 2,1 раза и на 55%, соответственно, чем через 2; 3; 4 и 5 нед. Через 3 нед объемная плотность сосудов была значимо выше на 12,1%, относительно 4 нед, выше на 24,9%, чем через 5 нед. Через 4 нед объемная плотность сосудов была выше на 39,9% по сравнению с данными через 5 нед (см. табл. 1).

Объемная плотность сосудов в участке операционной травмы после инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в проекции перевязанной вены через 1; 2 и 3 нед стала значимо больше на 31,8%; 45,6% и в 2 раза, соответственно, чем у интактных животных. Через 4 сут объемная плотность сосудов была ниже на 60,3%, чем через 3 нед. Объемная плотность сосудов через 2 нед была ниже на 45%, чем через 3 нед, но выше на 41,4%, чем через 4 нед. Через 3 нед объемная плотность сосудов была больше в 2,1 раза относительно с данных через 4 нед (см. табл. 1).

При лигировании вены без введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения количество мелких сосудов рядом с бедренной веной в единице среза через 1; 2; 3; 4 и 5 нед стало больше на 88,2%; в 2,2; 2,4; 3 и 2,3 раза, соответственно, чем у интактных животных. Через 4 сут содержание сосудов было ниже на 79%; в 2,1; 2,3; 3 и 2,2 раза, соответственно, чем через 1; 2; 3; 4 и 5 нед. Абсолютное количество сосудов через 1 нед было значимо меньше на 21,6; 34,3; 63,2 и 19,5%, соответственно, чем через 2; 3; 4 и 5 нед. Содержание сосудов через 4 нед было выше на 34,4; 21,6 и 36,6%, соответственно, чем через 2; 3 и 5 нед (табл. 2).

У ложнооперированных животных с введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения без изменения венозного кровотока содержание сосудов возле бедренной вены через 1 и 2 нед было больше на 66,8 и 64,2%, соответственно, чем у интактных животных. Через 4 сут число сосудов было ниже на 72,2 и 69,6%, соответственно, чем через 1 и 2 нед; через 1 нед – было больше на 50,8 и 61,9%, соответственно, чем через 4 и 5 нед. Абсолютное число сосудов через 2 нед было больше на 48,5 и 59,6%, соответственно, чем через 4 и 5 нед (см. табл. 2).

Таблица 2. Количество сосудов (N) после лигирования вены (M±m)

Группы крыс	Время после инъекции АММСККП					
	4 сут	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед	5 нед
	1	2	3	4	5	6
Вблизи лигированной вены						
Интактные	7,91±0,82					
Лигирование вены без АММСККП	8,32±0,91$^{2–6}$	14,8±1,03$^{*1,3–6}$	18,0±0,96^{*1,2,5}	19,9±0,90^{*1,2,5}	24,2±1,21$^{*1–4,6}$	17,7±0,90^{*1,2,5}
Ложнооперированные (инъекция АММСККП без блокады вены)	7,66±0,87^{2,3}	13,1±1,04^{*1,5,6}	12,9±1,10^{*1,5,6}	9,65±1,55	8,75±0,93^{2,3}	8,15±0,82^{2,3}
Введение АММСККП через кожу в проекции лигированной вены	8,66±0,88$^{2–4}$	14,5±0,90^{*1,3,5,6}	17,2±0,94^{*1,2,5,6}	16,6±1,24^{*1,5,6}	9,4±1,43$^{2–4}$	8,33±1,14$^{2–4}$
На участке разреза кожи						
Интактные	8,41±1,17					
Лигирование вены без АММСККП	8,76±0,95$^{2-6}$	15,3±1,15^{*1,4,5}	18,5±1,14^{*1,5}	20,2±1,16^{*1,2,5}	24,8±1,41$^{*1-4,6}$	16,9±1,16^{*1,5}
Ложнооперированные (инъекция АММСККП без блокады вены)	8,32±0,68^{2,3}	13,9±1,11$^{*1,4–6}$	14,0±1,31$^{*1,4–6}$	9,91±1,2^{2,3}	9,1±1,22^{2,3}	8,48±1,3^{2,3}
Введение АММСККП через кожу в проекции лигированной вены	9,2±0,81$^{2–4}$	14,9±1,06^{*1,5,6}	17,8±1,15^{*1,5,6}	17,2±1,53^{*1,5,6}	8,81±0,98$^{2–4}$	7,98±0,98$^{2–4}$

Абсолютное содержание сосудов возле бедренной вены после инъекции МСК в проекции перевязанной вены через 1; 2 и 3 нед было больше на 84,4%, в 2,3 и 2,2 раза, соответственно, чем у интактных животных. Через 4 сут число сосудов было ниже на 68,5; 99,6 и 92,7%, соответственно, чем через 1, 2 и 3 нед. Абсолютное содержание сосудов через 1 нед было меньше на 18,6%, чем через 2 нед, но больше на 55,3 и 75,2%, соответственно, чем через 4 и 5 нед, через 2 нед – выше на 83,9% и в 2 раза, соответственно, чем через 4 и 5 нед.

При лигировании вены без введения МСК абсолютное содержание сосудов в зоне хирургического разреза через 1; 2; 3; 4 и 5 нед стало больше на 83%; в 2,1; 2,3; 2,9 и 2,1 раза, соответственно, чем у интактных крыс. Через 4 сут всех сосудов было меньше на 75,5%; в 2,2; 2,4; 2,9 раза и на 93,9%, соответственно, чем через 1; 2; 3; 4 и 5 недели. Абсолютное содержание сосудов через 1 нед было меньше на 31,9 и 61,8%, соответственно, по сравнению с 3-й и 4-й неделями. Через 4 нед содержание сосудов было больше на 34; 22,8 и 46,6%, соответственно, чем через 2; 3 и 5 нед (см. табл. 2).

У ложнооперированных животных на фоне использования аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения без изменения венозного кровотока численность сосудов на единицу площади в регионе хирургического разреза через 1 и 2 нед была больше на 66,4 и 67,6%, соответственно, чем у интактных животных. Через 4 сут содержание сосудов стало ниже на 68,2 и 69,4%, соответственно, чем через 1 и 2 нед. Абсолютное содержание сосудов через 1 нед было больше на 41,2; 53,8 и 65%, соответственно, чем через 3, 4 и 5 нед. Через 2 нед содержание сосудов было выше на 42,2; 54,9 и 66,2%, соответственно, чем через 3, 4 и 5 нед (см. табл. 2).

Абсолютное содержание сосудов в очаге операционной травмы после инъекции МСК в проекции перевязанной вены через 1; 2 и 3 нед стало больше на 78,2%; в 2,2 и 2,3 раза, соответственно, относительно интактных животных. Через 4 сут содержание сосудов было ниже на 63%; 94,5% и 87,9%, соответственно, чем через 1; 2 и 3 нед. Абсолютное

содержание сосудов через 4 нед стало меньше на 70,2%; в 2,1 раза и на 96,2%, соответственно, по сравнению с результатами через 1; 2 и 3 нед. К 5-й неделе содержание сосудов было ниже на 87,8%; в 2,1 и 2,1 раза, соответственно, относительно данных через 1; 2 и 3 нед (см. табл. 2).

Таким образом, в обеих группах животных с использованием клеточных технологий (ложнооперированных с введением МСК без изменений кровотока и крыс после инъекции МСК в проекции лигированной вены) менее выражена степень возрастания лейкоцитарной, в частности нейтрофильной инфильтрации относительно группы с простым моделированием острого локального препятствия венозному кровотоку. Это, скорее всего, обусловлено иммуномодуляторным действием использованных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, их способностью снижать активность воспалительных процессов (Caplan A.I., 2009; Poncelet A.J. et al., 2009; Undale A.H J. et al., 2009; Yamaza T. et al., 2010; Charbord P., 2010). При лигировании вены без последующей коррекции было отмечено также более длительное и выраженное увеличение численной плотности сосудов, чем после применения клеточных технологий. Это тоже может быть связано с меньшей выраженностью воспалительного процесса в результате иммуномодуляторного эффекта МСК, меньшей выраженностью формирования грануляционной ткани и более ранней инволюцией сосудов.

ВЫВОДЫ

1. По данным комплексного патоморфологического анализа, лигирование бедренной вены как без введения, так и с введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, вызывает облитерацию перевязанного сосуда и быстрое его замещение соединительной тканью. Первоначально регистрируются морфологические признаки венозной гипертензии (обширные геморрагии, лимфостаз, периваскулярный отек), затем происходит реорганизация сосудистого русла с формированием одной крупной вены (в редких случаях) или нескольких более мелких (значительно чаще) из коллатеральных вен. Реорганизация коллатералей рядом с лигированной веной, компенсаторная перестройка микроциркуляторных сосудов тканевого микрорайона происходят без участия введенных МСК.

2. К особенностям репаративных процессов при острой венозной блокаде в условиях применения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения (по данным количественного морфологического анализа) относится снижение активности воспалительного процесса: уменьшение в месте хирургического вмешательства выраженности лейкоцитарной инфильтрации в 3,6 раза ($p<0,05$), численности нейтрофилов в 10^5 мкм^2 площади среза в 4,8 раза ($p<0,05$) по сравнению с манипуляциями без применения клеточной технологии. Использование аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения способствует более раннему исчезновению морфологических признаков воспалительного процесса (через 3 нед по сравнению с 4 нед без введения МСК).

3. Введенные в область хирургического вмешательства аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения участвуют в формировании сосудов грануляционной ткани (по данным люминесцентной микроскопии). Процессы ангиогенеза с участием МСК у крыс регистрируются уже через 4 сут и нарастают до 2 нед после введения. МСК не только полностью формируют все оболочки новообразованных сосудов, но и встраиваются в сосуды, формирующиеся из эндогенных клеток.

4. Лигирование вены без последующей коррекции аутологичными мультипотентными МСК костномозгового происхождения сопровождается более длительным и выраженным увеличением объемной плотности сосудов (через 5 нед в 1,6 – 1,95-раза, $p<0,05$) и их количества (через 5 нед в 2,1 раза, $p<0,05$) относительно крыс с введением МСК в проекции лигированной вены без изменений кровотока.

5. Введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения после хирургического вмешательства приводит к формированию значительно более обширного рубца, захватывающего и подлежащие ткани, чем оперативное вмешательство без применения клеточных технологий, что может быть обусловлено как дифференцировкой МСК в фибробласты, так и стимуляцией пролиферации и синтеза коллагена эндогенными фибробластами. В отдаленные сроки происходит уменьшение объема соединительной ткани из-за реорганизации рубца.

6. Введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в ткани, даже с неизмененной микроциркуляцией, сопровождается появлением обширных геморрагий как в месте инъекции, так и в регионарных лимфатических узлах. Размер геморрагий у крыс резко сокращается спустя 2 нед после инъекции.

7. Локальное применение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения на фоне ненарушенного кровообращения и лимфотока и неповрежденных тканей неэффективно или малоэффективно вследствие быстрой элиминации введенных клеток из места инъекции. В условиях интактного сосудистого русла, сохранности венозного и лимфатического оттока, большая часть введенных МСК быстро распространяется по всему организму, частично попадая в регионарные лимфатические узлы, где фагоцитируется макрофагами.

8. В лимфоидных узелках коркового вещества паховых лимфатических узлов после введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения формируются скопления крупных светящихся макрофагов. Появление макрофагов с детритом МСК в регионарных лимфатических узлах через 2 – 5 нед после введения свидетельствует о максимальной деструкции этих клеток и наиболее выраженной их элиминации из структур, созданных с их участием у крыс, именно в эти сроки.

9. Фагоцитоз введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения сопровождается быстрой деградацией гена зеленого флюоресцентного белка и самого протеина, тогда как Vybrant-CM-Dil, примененный для окрашивания мембран, разрушается очень медленно, что приводит к накоплению этого красителя в макрофагах с окрашиванием их мембран. Макрофаги приобретают способность к более интенсивной красной флюоресценции при облучении их ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина, чем инъецированные мультипотентные МСК.

10. Основные различия изменений микроциркуляции при флеботромбозе и локальном препятствии кровотоку по магистральной вене заключаются в том, что при тромбозе поражается участок сосуда на большом протяжении вместе с коллатералями, по которым тромбин ретроградно проникает глубоко в ткани и блокирует венозный отток даже по мелким сосудам. Проходимость магистральной вены при тромбозе быстро восстанавливается, но длительное время сохраняются нарушения микроциркуляции тканевого региона, для устранения которых необходима стимуляция ангиогенеза с развитием новых кровеносных сосудов не только рядом с магистральной веной, но и во всем тканевом регионе. При лигировании вены создается непроходимость сосуда только в одном месте, то есть локально. Застой компенсируется развитыми коллатералями, стимуляции ангиогенеза с вовлечением в процесс мультипотентных МСК не требуется, в данных условиях достаточно активно развивающейся грануляционной ткани в зоне операции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При использовании клеточной технологии, основанной на введении аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, следует учитывать, что не все попавшие в ткани МСК являются жизнеспособными. Часть из них и их детрит фагоцитируются макрофагами вследствие присутствия в геноме чужеродной ДНК и самого белка GFP, некоторых компонентов культуральной среды, вирусного вектора, используе-

мого для внедрения ДНК протеина GFP в геном МСК.

2. Для более точной идентификации введенных МСК в организм в условиях эксперимента целесообразно проводить не только трансфекцию ДНК зеленого флюоресцентного белка GFP, но и дополнительно окрашивать отдельные клеточные структуры веществами, светящимися в условиях применения других фильтров.

3. При проведении клеточной терапии необходимо учитывать возможность попадания части МСК и их детрита в кровеносное и лимфатическое русло с диссеминацией по всему организму и фагоцитозом периваскулярными макрофагами даже в удаленных от места повреждения тканях.

4. Применение клеточных технологий для стимуляции восстановления тока крови при локальной блокаде магистральной вены не целесообразно, адекватный венозный отток восстанавливается через расширение и реорганизацию уже имеющихся коллатералей без формирования новых сосудов. В то же время введенные МСК принимают участие в формировании грануляционной ткани в месте хирургического вмешательства, что ускоряет развитие репаративных процессов.

5. При введении МСК необходимо принимать во внимание возможность возникновения значительных нарушений микроциркуляции, появления обширных геморрагий как в месте инъекции, так и в регионарных ЛУ.

6. Следует учитывать, что инъекции МСК после хирургического вмешательства, могут сопровождаться обширным рубцеванием, захватывающим и подлежащие ткани. Процессы склерозирования носят обратимый характер, впоследствии возможна реорганизация рубца с уменьшением объема соединительной ткани.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Морозов В.В., Шевела А.И., Матвеева В.А., Мошак С.В., Частикин Г.А., Серяпина Ю.В., Аникеев А.А., Майбородин И.В. Участие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в восстановлении лимфотока при венозном тромбозе в эксперименте // Материалы XII международной конференции, посвященной 25-летию НИИ клинической и экспериментальной лимфологии «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям». – Новосибирск, 2016. – С. 171-173.

2. Шевела А.И., Майбородин И.В., Аникеев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В. Возможность использования клеточных технологий для восстановления кровотока при лигировании магистральной вены // Сборник тезисов 9-ого Санкт-Петербургского венозного форума «Актуальные вопросы флебологии». – С.-Пб.: изд-во Альта Астра, 2016. – С. 228-230.

3. Maiborodin I.V., Morozov V.V., Matveeva V.A., Chastikin G.A., Moshak S.V., Onoprienko N.V., Seryapina Y.V., Anikeev A.A. Possibility of using mesenchymal stromal cells to restore lymph flow in experimental phlebothrombosis // **Bull. Exp. Biol. Med. – 2016. - Vol. 160, № 4. – P. 565-570.** doi: 10.1007/s10517-016-3219-3.

4. Майбородин И.В., Морозов В.В., Матвеева В.А., Шевела А.И., Аникеев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Частикин Г.А. Восстановление кровотока в конечности после лигирования магистральной вены при использовании клеточных технологий в эксперименте // **Флебология. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 126-136.**

5. Майбородин И.В., Морозов В.В., Шевела А.И., Аникеев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Частикин Г.А. Особенности микроциркуляторных нарушений при экспериментальном флеботромбозе и локальной блокаде вены // **Флебология. – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 182-189.**

6. Майбородин И.В., Морозов В.В., Аникеев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В.,

Частикин Г.А., Матвеева В.А., Майбородина В.И. Макрофагальный ответ у крыс на введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в регион хирургической травмы // **Новости хирургии. – 2017. – Т. 25, № 3. – С. 233-241.**

7. Майбородин И.В., Морозов В.В., Аникеев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Частикин Г.А. Сравнительный анализ морфологических изменений при экспериментальном тромбозе и лигировании вены // Морфология. – 2017. – Т. 151, № 2. – С. 56-64.

8. Maiborodin I.V., Morozov V.V., Matveeva V.A., Anikeev A.A., Maslov R.V., Chastikin G.A., Figurenko N.F. Initial stages of angiogenesis after acute experimental local venous outflow disturbances and application of cell technologies // **Bull. Exp. Biol. Med. – 2017. – Vol. 163, № 1. – P. 142-147.** doi: 10.1007/s10517-017-3755-5.

9. Майбородин И.В., Шевела А.И., Морозов В.В., Аникеев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Хоменюк С.В. Особенности тканевой реакции после лигирования вены конечности в эксперименте // **Флебология. – 2017. – Т. 11, № 3. – С. 154-163.**

10. Maiborodin I.V., Morozov V.V., Matveeva V.A., Anikeev A.A., Figurenko N.F., Maslov R.V., Chastikin G.A., Maiborodina V. I. Results of experimental ligation of the main vein with the use of cell technologies // **Bull. Exp. Biol. Med. – 2017. – Vol. 164, № 1. – P. 61-67.** doi: 10.1007/s10517-017-3926-4.

11. Maiborodin I.V., Morozov V.V., Anikeev A.A., Maslov R.V., Figurenko N.F., Matveeva V.A., Maiborodina V.I. Some Peculiarities of Local Distribution of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells after Their Injection into Intact Muscle Tissue in Experiment // **Bull. Exp. Biol. Med. – 2018. – Vol. 164, № 4. – P. 554-560.** doi: 10.1007/s10517-018-4031-z.

12. Maiborodin I.V., Morozov V.V., Anikeev A.A., Figurenko N.F., Maslov R.V., Matveeva V.A., Maiborodina V.I. Injection of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells as a Cause of Hemorrhages in the Regional Lymph Nodes: Experimental Study // **Bull. Exp. Biol. Med. – 2018. – Vol. 164, № 6. – P. 784-789.** doi: 10.1007/s10517-018-4080-3.

13. Аникеев А.А., Шевела А.А., Лушникова Е.Л., Майбородин И.В. Особенности флюоресценции макрофагов в участках лизиса некротизированных мышц при моделировании острой венозной блокады // **Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 5;** URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=30173

Соискатель А.А.Аникеев