

П.В. МАРКАУЦАН, А.А. БАЕШКО, Л.И. АРЧАКОВА

**ИЗМЕНЕНИЯ ИНТИМЫ ВЕНЫ ПРИ ЗАМЕДЛЕНИИ
КРОВотоКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Научно-исследовательский институт физиологии Академии наук Республики Беларусь,
Республика Беларусь

Замедление кровотока в ранний период (первые минуты – сутки) вызывает повреждение интимы за счет гипоксии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. К 5-ой минуте эксперимента лейкоциты располагаются вдоль внутренней оболочки вены, на 15-ой массивно инфильтрируют её стенку. При этом наблюдается набухание и очаговое нарушение целостности эндотелия (главным образом цитоплазматической части клетки), фрагментация внутренней эластической мембраны. Преимущественно на апикальной поверхности эндотелиоцитов увеличивается количество микроворсинок. В субэндотелиальном слое увеличивается содержание коллагеновых волокон. В отдельных случаях имеет место образование «микротромбов», состоящих из единичных лейкоцитов и тромбоцитов, адгезированных к люминальной поверхности вены. В тоже время в интимае достаточно динамично протекают адаптационные процессы, направленные на минимизацию повреждений и частичное восстановление ее ультраструктуры.

Ключевые слова: замедление кровотока, бедренная вена крысы, лейкоциты.

Blood flow retardation in the early period (the first minutes – days) causes intima damage due to hypoxia and transendothelial leukocyte migration. Leukocytes have been located along the inner vein coat by the 5th minute of the experiment, during the 15th minute they are massively infiltrating its wall. Swelling and focal disturbance of endothelium integrity (mainly of cytoplasm cell part) are observed as well as inner elastic membrane fragmentation. The number of microvilli increases chiefly on the endotheliocytes apical surface. The collagenous fibers content increases in the subendothelial layer. In several cases formation of «microthrombi», consisting of single leukocytes and thrombocytes, adhesived to the vein luminal surface, takes place. At the same time adaptation processes occur actively in intima, aimed to minimize the damages and to restore its ultra structure.

Keywords: blood flow retardation, rat's femoral vein, leukocytes.

В настоящее время число больных с поражениями глубоких вен нижних конечностей тромботического генеза достаточно велико и продолжает неуклонно расти [6]. Основными этиологическими факторами развития данной патологии являются замедление кровотока (ЗК) и изменения в системе гемостаза. Венозный застой возникает вследствие нарушения функционирования мышечно-венозной «помпы» голени во время операции (венодилатиру-

ющее влияние миорелаксантов), в послеоперационном периоде, а также у терапевтических больных (инфаркт миокарда, нарушение мозгового кровообращения и др.) [1]. Цель настоящего исследования – выявить закономерности структурных изменений в интимае вены при ЗК в эксперименте. До сих пор не достаточно полно изучены морфологические изменения внутренней оболочки вены в ранние сроки ЗК (первые минуты – сутки), определяющие

дальнейшее морфо-функциональное состояние сосуда.

Материалы и методы

Эксперимент поставлен на 34 беспородных крысах-самцах массой 300-350 гр. Венозный застой создавали путем лигирования левой общей подвздошной вены. Для этого выполняли нижнюю срединную лапаротомию, затем вскрывали забрюшинное пространство и находили *v. iliaca communis sinistra*. Последнюю выделяли из забрюшинной клетчатки и перевязывали полиамидной нитью размером 5/0, впадающие коллатерали не лигировали. Выполняли гемостаз и послеоперационную рану послойно ушивали. Забор сосуда (бедренная вена) для электронно-микроскопического исследования осуществляли на 5, 15, 30, 60-й минутах, через 3, 12 ч, на 1-ые и 3-и сутки. В качестве контроля служила бедренная вена контрлатеральной стороны. Фиксацию гистологического материала проводили непосредственно в операционной ране, орошая бедренный сосудисто-нервный пучок раствором глутарового альдегида либо путем перфузии кровеносной системы животного данным раствором. Фрагменты вен площадью 1 мм² фиксировали сначала в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида, затем в 1%-ном растворе OsO₄. Дальнейшую дегидратацию, проводку и заливку образцов в аралдит осуществляли по общепринятой методике [4]. Ультратонкие срезы (4-6 из каждого блока) получали с помощью ультратома фирмы LKB (Швеция), контрастировали цитратом свинца по Reynolds [9] и исследовали с помощью электронного микроскопа JEM 100B и JEM 100CX (Япония). Для ручной морфометрии была использована программа Scion Image версия 4.0.2, разработанная для Windows корпорацией Scion (<http://www.scioncorp.com>), на основе программы

NIH Image для Macintosh, созданной Wayne Rasband из National Institute of Health, USA.

Результаты и обсуждение

Интима интактной бедренной вены крысы состояла из эндотелиальных клеток (короткая ось ядра составляла $1,02 \pm 0,05$ мкм, толщина цитоплазматической части – $0,159 \pm 0,007$ мкм), субэндотелиального слоя и внутренней эластической мембраны (ВЭМ). Последняя выявлялась не всегда. Электронно-микроскопически в эндотелиоцитах можно было выделить три структурно-функциональные зоны: ядерную, околоядерную, цитоплазматическую, а также три поверхности: люминальную, базальную (аблюминальную) и контактную. Это были одноядерные клетки, ядра которых, как правило, находились в центральной части клетки, отчетливо выступали в просвет сосуда, имели слегка округлую вытянутую форму с глыбчатым расположением хроматина и неглубокими инвагинациями ядерной оболочки (рис. 1). Субэндотелиальный слой и ВЭМ имели толщину $0,254 \pm 0,012$ мкм и $0,301 \pm 0,014$ мкм соответственно, хотя эти показатели менялись на различных участках внутренней оболочки сосуда.

Как показали результаты наших исследований, ЗК приводило к изменениям в интиме уже на 5-ой минуте эксперимента. Так, в цитоплазматических отростках эндотелиоцитов (ЦОЭ) появлялись пузырьки, по высоте соответствующие безъядерной части эндотелия. Кроме того, в них увеличивалось число мелких внутрицитоплазматических везикул. У внутренней оболочки вены появлялись лейкоциты, некоторые из них были адгезированы к люминальной поверхности сосуда (рис. 2). Изменение толщины ЦОЭ в сравнении с контрольным показателем представлено в таблице 1.

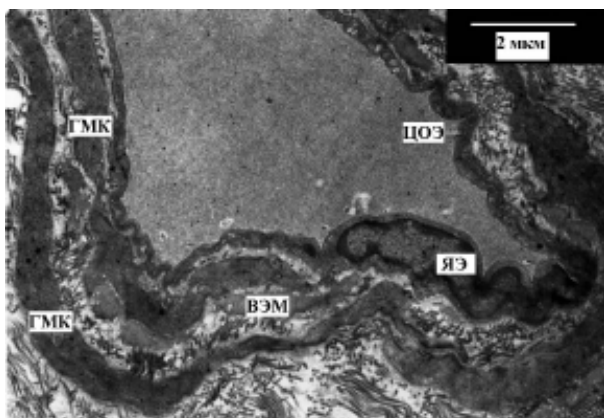


Рис. 1. Ультраструктурная организация интактной вены. ЯЭ – ядро эндотелиоцита, ВЭМ – внутренняя эластическая мембрана, ГМК – гладкомышечная клетка, ЦОЭ – цитоплазматический отросток эндотелиоцита.

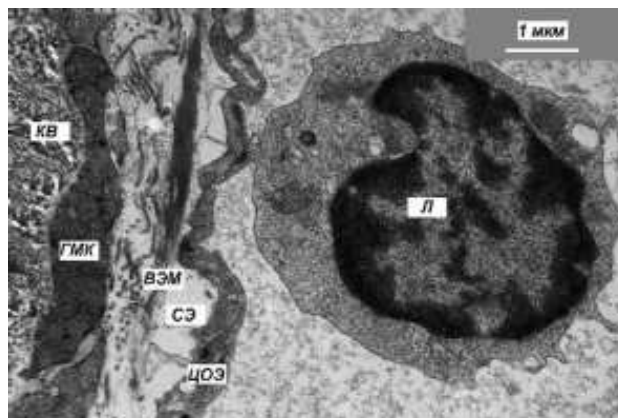


Рис. 2. Адгезия лейкоцита к интиме на 5-й минуте замедления кровотока. КВ – коллагеновые волокна, Л – лейкоцит, СЭ – субэндотелиальный слой.

На 15-ой минуте отмечалось интенсивное набухание ЦОЭ, которое проявлялось в виде образования округлых либо реже слегка растянутых по ширине везикул. Размеры пузырьков варьировали от крупных до очень мелких. По периметру крупных пузырьков располагалась узкая полоска электронноплотного материала. Центральная их часть выглядела, как правило, однородной субстанцией, и лишь в редких случаях имела вкрапления материала повышенной электронной плотности. В некоторых везикулах сосредоточение электронноплотной субстанции происходило на одной из поверхностей, чаще базальной. Ядра

эндотелиоцитов подвергались набуханию в меньшей степени: изредка регистрировались небольшие пузырьки, чаще со стороны базальной поверхности, только лишь в единичных случаях встречались огромные везикулы, охватывающие часть ядерного аппарата клетки.

Наблюдалась очаговая десквамация эндотелия и фрагментация ВЭМ. ВЭМ имела в большинстве случаев прерывистый характер, состояла из небольших фрагментов. В щелях между ними располагались участки ЦО эндотелиоцитов, а также кое-где отростки ГМК, причем последние отчетливо контактировали с клетками эндотелия.

Таблица 1

Изменение толщины (мкм) ЦОЭ при ЗК

№/№	Время эксперимента	Толщина ЦОЭ
1.	5 мин	0,34 ± 0,05
2.	15 мин	2,05 ± 0,10
3.	30 мин	1,71 ± 0,01
4.	60 мин	0,55 ± 0,02
5.	3 ч	0,47 ± 0,02
6.	12 ч	0,36 ± 0,02
7.	1-е сут	0,36 ± 0,01
8.	3-е сут	0,34 ± 0,02

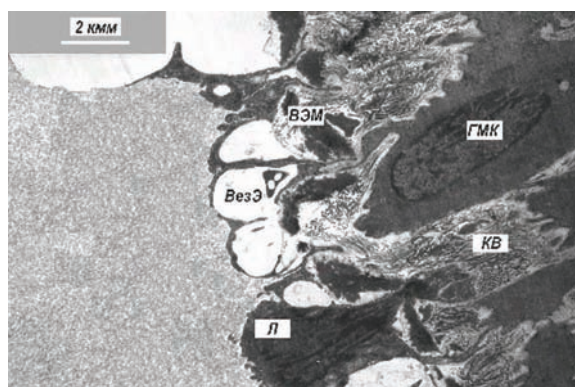


Рис. 3. Трансэндотелиальная миграция лейкоцита на 15-ой минуте замедления кровотока. ВезЭ – везикулы эндотелия.

Вновь образованные фрагменты ВЭМ располагались часто не линейно, а под углом друг к другу, образуя подобие волнистой линии.

Регистрируемые изменения в эндотелии обусловлены повреждением мембран клеток в связи с их механо-осмотическим растяжением, как результат развития внутрисосудистой гипертензии, и возникновением гипоксии. Кислородное голодание вызывает недостаточность натрий-калиевого насоса и функции ионных каналов, что приводит к утрате физиологических трансмембранных ионных градиентов и избыточному входному току натрия и воды в клетку [2]. Наряду с этим наблюдается избыточный входной ток кальция в клетку, который активирует мембранные фосфолипазы А, приводя к освобождению из фосфолипидов поврежденной мембраны арахидоновой кислоты. Свободная арахидоновая кислота окисляется и приводит к образованию простагландинов (PgD_2 , PgE_2), тромбоксанов (TxA_2), а также эйкозанополиеновых кислот (5-НЕТЕ, 12-НЕТЕ) и лейкотриенов (LtA_4 , LtB_4 , LtC_4). Простагландины повышают сосудистую проницаемость и расширяют микрососуды. 5-НЕТЕ является мощным хемоаттрактантом полимор-

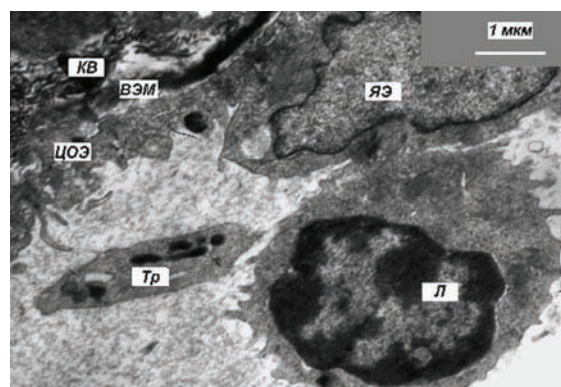


Рис. 4. Ультраструктурная организация венозной стенки на 3-и сутки замедления кровотока. К интиме адгезирован «микротромб», состоящий из лейкоцита и тромбоцита. Тр – тромбоцит.

фонуклеарных лейкоцитов, а LtA_4 и LtB_4 служат медиаторами краевого стояния лейкоцитов и адгезии тромбоцитов [10].

Этот период эксперимента характеризовался интенсивной инфильтрацией стенки вены лейкоцитами. Миграция последних вглубь сосуда происходила через стыки эндотелиоцитов, между фрагментами ВЭМ, либо на участках интимы, где эндотелий был десквамирован (рис. 3). Этот процесс осуществляется благодаря взаимодействию определенных групп рецепторов (селектинов, интегринов и др.) и обусловлен выделением из эндотелиальных и тучных клеток венозной стенки биологически активных веществ (гистамин, серотонин, простагландины, лейкотриены и др.) в ответ на гипоксию [7, 8, 11]. Активированные лейкоциты выделяют ряд протеолитических ферментов, воздействующих на набухший эндотелий, что также способствует его очаговому отторжению [2].

При фиксации гистологического материала методом перфузии, прохождение глутарового альдегида способствовало «вымыванию» клеток эндотелия (в интактных венах этого не наблюдалось), лишь на некоторых участках интимы определялись небольшие их фрагменты. Это также свиде-

тельствоvalo о нарушении контакта эндотелиоцитов с подлежащими структурами и более легким их отторжением при замедлении кровотока.

К 30–60-ой минутам венозного полнокровия степень набухания ЦОЭ уменьшалась ($p < 0,01$), крупные везикулы обнаруживались реже. Уменьшение набухания эндотелия, вероятно, обусловлено адаптацией эндотелия к внутрисосудистой гипертензии и гипоксии, за счет чрезвычайно динамического состояния плазмолеммы и везикулярной системы клетки, которая с помощью микропиноцитозных пузырьков способна транспортировать фрагменты мембран из неповрежденного участка туда, где имеется ее дефект – «штопка» мембран [5]. Кроме того, нельзя исключать и влияние ряда других факторов, в частности, улучшения питания венозной стенки по *vasa vasorum*, усиления лимфатического дренажа и некоторого снижения гидростатического давления в следствие увеличения оттока крови из обтурированной вены по коллатеральным сосудам.

Площадь десквамации эндотелия увеличивалась, особенно за счет цитоплазматической части клеток. ВЭМ выглядела фрагментированной с неровными контурами, обращала на себя внимание неоднородность ее структуры.

Спустя 3–12 ч с начала эксперимента набухание эндотелия продолжало уменьшаться ($p < 0,01$). Отмечалось некоторое снижение электронной плотности цитоплазмы эндотелиоцитов, при этом ядра выглядели более отчетливо. В эндотелиальных клетках содержится большое количество микропиноцитозных везикул. Кроме того, плазмолемма ЦОЭ образовывала множество субмикроскопических выпячиваний (микроворсинок), количество которых преобладало на апикальной поверхности клетки. Формирование этих выпячиваний, возможно, является компенсаторной реакци-

ей эндотелия на гипоксию, благодаря чему увеличивается площадь мембраны клетки и соответственно улучшается ее питание.

Субэндотелиальный слой выглядел отечным, нередко участки цитоплазмы эндотелиальных клеток проникали вглубь его. В интимае наблюдалось большое содержание коллагеновых волокон, что, скорее всего, связано с активацией коллагенообразования фибробластами и гладкими миоцитами [3].

Структура ВЭМ принимала более однородный характер, что, возможно, обусловлено некоторым снижением гидростатического давления в сосуде и уменьшением гипоксии, а также синтезом эластина фибробластами.

На 1-е–3-и сутки эксперимента в цитоплазме эндотелиоцитов отмечалось множество мелких пузырьков (крупные встречались в единичных случаях), на поверхности клеток выявлялись мелкие выпячивания плазмолеммы. К этому сроку достоверного уменьшения толщины цитоплазматической части эндотелия по сравнению с предыдущим сроком наблюдения не установлено ($p > 0,05$), что свидетельствовало о некоторой стабилизации патологического процесса. В местах десквамированного или поврежденного эндотелия нередко выявлялись «микротромбы», состоящие из единичных лейкоцитов и тромбоцитов, адгезированных, как правило, к выступающим в просвет сосуда коллагеновым волокнам субэндотелиального слоя (рис. 4).

Таким образом, морфологическая перестройка внутренней оболочки стенки вены при ЗК имеет определенную динамику. Структурные элементы интимы весьма чувствительны к ЗК, что вызывает набухание эндотелия, фрагментацию и изменение структуры ВЭМ, а также трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов – одну из причин десквамации эндотелия. В то же время во внутренней оболочке вены достаточно динамично протекают и адаптационные

процессы, направленные на минимизацию повреждений и частичное восстановление ее гистоархитектоники.

Выявленные структурные изменения стенки вены при ЗК являются основой для выработки практических рекомендаций по профилактике тромбоза глубоких вен у больных с высоким риском его развития не только посредством изменения коагуляционного потенциала крови и ускорения кровотока, но и назначения фармакологических препаратов, тормозящих адгезию и последующую миграцию лейкоцитов в сосудистую стенку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баешко, А. А. Послеоперационный тромбоз глубоких вен нижних конечностей и тромбоз эмболия

- легочной артерии / А. А. Баешко. – М., 2000.
2. Зайчик, А. Ш. Основы общей патологии. Основы общей патофизиологии: учебное пособие / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – СПб., 1999. – Ч. 1.
3. Руководство по гистологии / под ред. Р. К. Данилова. – СПб., 2001. – Т. 1.
4. Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих: пер. с англ. / Б. М. Уикли. – 1975.
5. В. А. Шахламов [и др.] // Морфология. – 2000. – № 5. – С. 25–29.
6. Benard, E. // Presse Med. / E. Benard, A. Lafuma, P. Ravaud. – 2005. – Vol. 34, N 6. – P. 415–419.
7. C. Closse [et al.] // Thromb. Res. – 1997. – Vol. 85. – P.159–164.
8. C. L. Klein [et al.] // Pathobiology. – 1995. – Vol. 63, N 1. – P. 1–8.
9. Reynolds, E. S. // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol.17. – N 2. – P. 208–210.
10. S. S. Signorelli [et al.] // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2000. – Vol. 22, N 4. – P. 311–316.
11. Stewart, G.J. // Haemostasis. – 1993. – Vol. 23. – P. 127–140.

Поступила 30.11.2007г.