

*Ю.С. Небылицин,
С.А. Сушков,
И.В. Самсонова,
О.Д. Мяделец,
Л.И. Арчакова,
П.В. Маркауцан*

**Структурные изменения сосудистой стенки при
экспериментальном моделировании венозного тромбоза**

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

Тромбоз глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей и связанная с ними тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) представляют серьезную проблему современного здравоохранения, являясь одной из основных причин летальности в большинстве развитых стран, а также нередко тяжелой инвалидизации больных [1,7,8,12,14,15,16,18]. В долгосрочной перспективе распространенный тромбоз глубоких вен нижних конечностей ведет к формированию постромбофлебитической болезни, проявляющейся хронической венозной недостаточностью вплоть до развития трофических язв, что существенно снижает трудоспособность и качество жизни пациентов [1,7,16]. По данным ряда авторов [1,16], у перенесших острый венозный тромбоз больных в 15 % случаев наблюдаются рецидивы.

Ежегодно прижизненно выявляют около 160 случаев венозного тромбоза на 100 000 населения [15,16]. При этом наиболее эмболоопасной локализацией ТГВ является бассейн нижней полой вены, с которым связано около 90% всех ТЭЛА [1,16,18].

Формирование венозного тромба, как правило, происходит на неизменной патологическим процессом стенке и связано с гиперкоагуляцией крови и снижением скорости кровотока [17]. Большое значение в развитии тромбозов играет состояние сосудистого эндотелия, который способен менять свой антитромботический потенциал на тромбогенный. Это может происходить при гипоксии, повреждении стенок сосудов физическими и химическими агентами, под влиянием экзо-и эндотоксинов, антиэндотелиальных и антифосфолипидных антител, клеточных и плазменных протеаз [2]. В свою очередь острый тромбоз приводит к развитию изменений венозной стенки, связанных с нарастанием воспалительного процесса, в результате чего вены теряют свои функциональные свойства [5,9].

В связи с этим изучение в динамике состояния эндотелиальной системы и структурных изменений венозной стенки после нарушения венозного кровотока и выяснение характера развивающихся процессов являются основой для понимания возникновения клинических проявлений, механизмов их развития и оценки патогенетической значимости, определения роли в формировании осложнений, в том числе летальных, а

также выбора оптимальной тактики ведения больных и разработки новых методов диагностики и лечения. Однако, наиболее точную информацию о стадийности тромботического процесса можно получить лишь экспериментальным методом.

Цель работы. Изучить в динамике структурные изменения сосудистой стенки при экспериментальном моделировании тромбоза глубоких вен системы нижней полой вены.

Материал и методы

Опыты проведены на 60 беспородных крысах-самцах массой 300-350 г. Контрольную группу составили 10 здоровых животных. Замедление кровотока у опытных животных вызывали лигированием общей подвздошной вены свободной тазовой конечности. Для этого после определения пульсации подвздошной артерии в месте её проекции производили разрез кожи и подкожной клетчатки длиной 4-5 см. Тупо расслаивая мышцы, выделяли сосудисто-нервный пучок, определяли в нём наружную подвздошную вену и перевязывали её. Тромбоз воспроизводили путем введения 0,3 мл подогретого до 37-37,50С раствора тромбина (40 ЕД/кг). После этого рану ушивали послойно. Материалом для морфологического исследования служили интактные и тромбированные вены крыс. Забор материала производили на 15, 30 минутах, 1, 3, 5, 15, 30, 60 сутки.

Для световой микроскопии материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. После стандартной проводки готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином-эозином, по Харту и по Гейденгайну [4,6,11,13]. Оценка морфологических изменений проводилась на световом оптическом уровне при увеличении $\times 100$ и $\times 200$, с помощью микротелевизионного комплекса Квант-2005 при увеличении $\times 1200$.

Для проведения электронной микроскопии иссеченные участки тканей помещали в 4% раствор параформа, а затем фиксировали в 1%-м растворе четырехокси осмия (рН 7,4) на протяжении 2 часов при 40С. После завершения осмиевой фиксации фрагменты вен обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, ацетоне и заливали в эпон-аралдитную смолу. Ультратонкие срезы получали с помощью ультратома фирмы LKB (Швеция), контрастировали в водном растворе уранилацетата и растворе цитрата свинца. Срезы изучали и фотографировали в электронном микроскопе JEM 100B и JEM 100CX (JEOL, Япония, увеличение $\times 4800-29\ 000$) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты и обсуждение

Морфологическая картина интактной вены:

Исследование гистоструктуры стенки вены контрольных животных показало соответствие ее строения имеющимся в литературе описаниям [3]. Четко определялись три оболочки: tunica intima, tunica media и tunica adventitia (рис. 1). При этом в просвете вены содержалось небольшое количество форменных элементов.

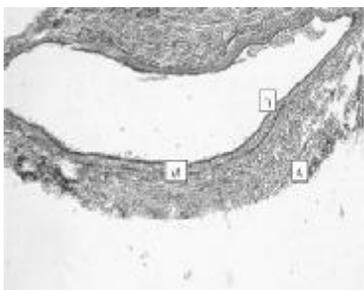


Рис. 1. Морфологическая картина интактной венозной стенки. Окраска по Харту (x100). Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

Внутренняя оболочка (tunica intima) была представлена непрерывным монослоем эндотелиальных клеток, лежащих на базальной мембране. В мышечной оболочке (tunica media) четко определялись 2-3 слоя гладких миоцитов. Адвентициальная оболочка была развита хорошо и содержала толстые коллагеновые волокна. В срезах вен всех контрольных животных выявлялись прерывистые наружная и внутренняя эластические мембраны, интенсивно окрашиваемые по Харту. Однако, внутренняя эластическая мембрана была более четкой и менее прерывистой по сравнению с наружной, которая в некоторых участках отсутствовала.

Электронно-микроскопическое исследование вен показало наличие эндотелиальной выстилки на всем протяжении. Эндотелиоциты в основном представляли собой одноядерные клетки, утолщенные в области расположения ядер. Ядра находились в центральной части клетки, имели вытянутую иногда неправильную форму. В некоторых случаях ядра были изрезаны неглубокими инвагинациями. Хроматин чаще был локализован вдоль ядерной мембраны, но иногда встречалось и его глыбчатое расположение (рис. 2). В некоторых случаях кроме одноядерных встречались дву- и многоядерные клетки.

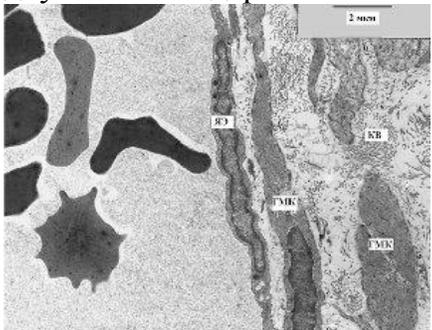


Рис. 2. Ультраструктурная организация интактной вены. ЯЭ – ядро эндотелиоцита, ГМК – гладкомышечная клетка, КВ – коллагеновые волокна. Митохондрии располагались преимущественно в околоядерной и цитоплазматической зонах. Большинство из них имели немногочисленные кристы. Комплекс Гольджи был представлен небольшими пузырьками, расположенными вокруг ядра. В цитоплазме, преимущественно в периферических участках клетки, выявлялись единичные полисомы, рибосомы и микрофибриллы. В периферической зоне эндотелиальных клеток наблюдалось наличие пузырьков и включений различных размеров.

Множество микропиноцитозных пузырьков располагалось по цитоплазме свободно во всех отделах клетки.

Цитоплазматические отростки (ЦО) эндотелиоцитов имели вытянутую форму и небольшую толщину. В некоторых случаях они проникали в субэндотелиальный слой (рис. 3).

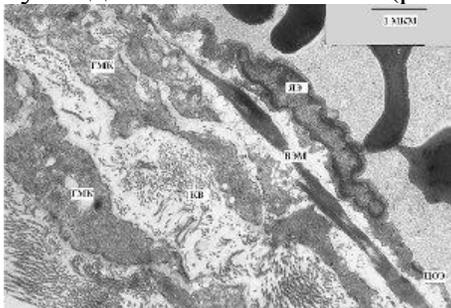


Рис. 3. Ультраструктурная организация интактной вены. ЯЭ – ядро эндотелиоцита, ВЭМ – внутренняя эластическая мембрана, ГМК – гладкомышечная клетка, ЦОЭ – цитоплазматический отросток эндотелиоцита, КВ – коллагеновые волокна.

Базальная поверхность эндотелиоцитов часто контактировала с клетками, расположенными в субэндотелиальном слое и иногда с клетками tunica media. В контактной зоне эндотелиоциты образовывали плотные контакты друг с другом. В различных участках интимы толщина субэндотелиального слоя была неодинаковой.

Морфологические изменения сосудистой стенки при остром тромбозе глубоких вен системы нижней полой вены:

Исследования стенки вен через 15 минут после развития ТГВ показало резкое расширение просвета и повышенное содержание расположенных компактно форменных элементов крови (преимущественно эритроцитов). При этом мышечная оболочка была несколько истончена, адвентициальная же – без видимых изменений. Изучение наружной и внутренней эластических мембран показало их фрагментированность, более выраженную, однако, в первой (рис.4).

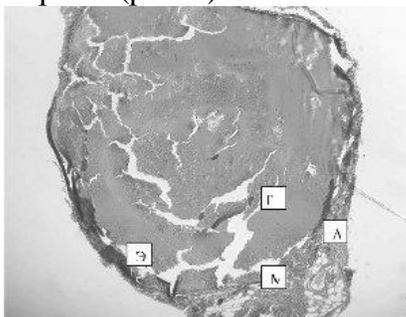


Рис. 4. Морфологические изменения венозной стенки через 15 минут после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска по Харту (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

Эндотелий был сохранен на всем протяжении, однако выглядел несколько набухшим и имел волнистый характер. Данное состояние определялось выбуханием ядродержащей части некоторых эндотелиоцитов как в просвет

вены, так и к его окружающим клеткам, плазмолеммальным пузыревидным выпячиванием, некоторым вдавлением вглубь сосуда. Выпячивания ядерной мембраны внедрялись вглубь интимы и располагались между фрагментами внутренней эластической мембраны (ВЭМ) и коллагеновых волокон (КВ). Над этими выпячиваниями имелось истончение цитоплазматической мембраны, которая на всем протяжении имела точечные разрывы с очаговой деструкцией. В ЦО регистрировались небольших размеров пузырьки. Местами наблюдалось отслоение эндотелия, ослабление их контактных взаимодействий. Регистрировалось закрытие образовавшихся дефектов многочисленными выростами рядом расположенных фрагментов плазмолеммы (рис. 5).

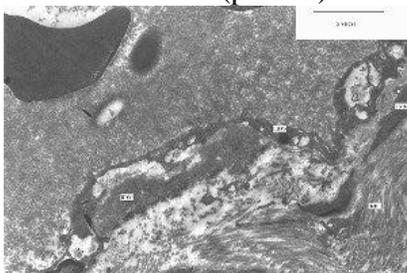


Рис. 5. Ультраструктурная организация вены на 15-й минуте после экспериментального моделирования тромбоза. Очаговое нарушение целостности эндотелия. Фрагментация

Через 30 минут изменения гистоструктуры вен нарастали и наряду с повышенным содержанием форменных элементов в их просвете определялись нити фибрина (рис.6).

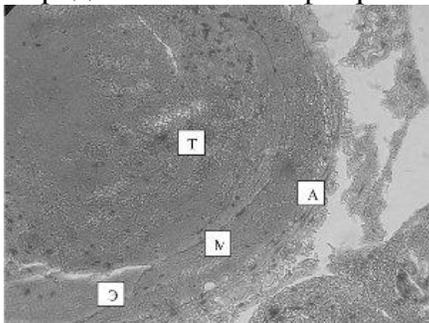


Рис. 6. Морфологические изменения венозной стенки через 30 минут после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

Во внутренней оболочке отмечалось набухание эндотелиальных клеток и их ядер и отек и разрыхление базальной мембраны. Изменения наружной и внутренней эластических мембран были аналогичны таковым на 15-й минуте эксперимента.

Проведение трансмиссионной электронной микроскопии также показало набухание и вакуолизацию многих эндотелиоцитов, захватывающие цитоплазматическую часть клеток. В ЦО обнаруживались пузырьки, вакуоли и органеллы. Как правило, везикулы были небольших размеров и располагались группами. Они в основном были локализованы возле

базального полюса. Здесь же были видны и крупные вакуоли. Возможно, вакуолизация происходила за счет образования большого количества пиноцитозных пузырьков и вакуолизации органелл. Выявлялось также набухание ядер эндотелиоцитов, но в значительно меньшей степени, чем ЦО. В просвете вен наблюдалось краевое стояние лейкоцитов без их миграции в стенку сосуда (рис. 7). ВЭМ в местах поврежденного эндотелия выглядела неоднородной по толщине и структуре, разрыхленной, имела точечные разрывы.

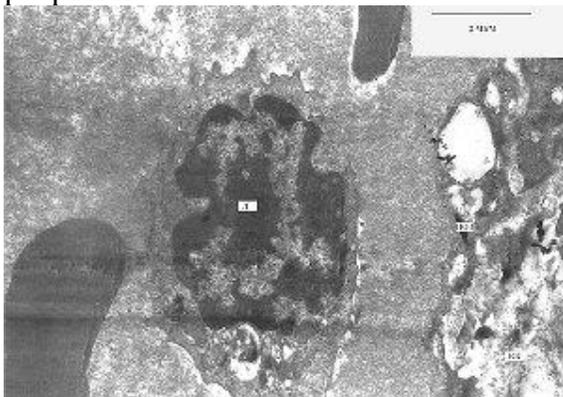


Рис. 7. Ультраструктурная организация вены через 30 минут после экспериментального моделирования тромбоза. Отек субэндотелиального слоя. Возле люминальной поверхности интимы располагается лейкоцит. Л – лейкоцит, ЦОЭ – цитоплазматический отросток эндотелиоцита, КВ – коллагеновые волокна.

В средней и наружной оболочках также отмечался отек. Гладкомышечные клетки имели извитую поверхность, наблюдалось нарушение их продольной ориентации. При электронно-микроскопическом исследовании их цитоплазма выглядела уплотненной, с повышенным содержанием небольших пузырьков и вакуолизацией отдельных митохондрий. Кроме того, определялось набухание отдельных КВ и основного вещества. Степень разобщения КВ увеличивалась, в некоторых случаях поперечная исчерченность не определялась.

Через 24 часа после моделирования острого тромбоза просвет вены оставался расширенным и в нем определялся обтурирующий тромб, состоящий из фибрина, большого количества эритроцитов, мелких скоплений тромбоцитов и единичных лейкоцитов. В tunica intima стенки вены на большом протяжении определялось набухание эндотелиоцитов с увеличением и гиперхромией их ядер и смещением ядерно-цитоплазматического отношения в сторону ядра. В некоторых участках отмечались выраженные дистрофические изменения эндотелия и в отдельных – его исчезновение (рис. 8, 9, 10).

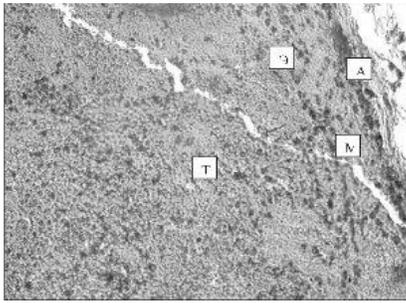


Рис. 8. Морфологические изменения венозной стенки через 24 часа после экспериментально вызванного тромбоза. Гематоксилин-эозин x1000. Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

При электронно-микроскопической картине эндотелиальная выстилка определялась практически на всей люминальной поверхности. Эндотелиоциты были набухшими, отмечалось нарушение целостности плазмолеммы и уменьшение объема цитоплазматической части. Кроме этого, в этих клетках регистрировалось увеличение электронной плотности цитозоля и образования цитоплазматических выростов, а также изменение формы митохондрий. Ядра эндотелиоцитов имели продолговатую форму; кариолемма образовывала небольшие выпячивания, направленные вглубь субэндотелиального слоя (рис. 9).

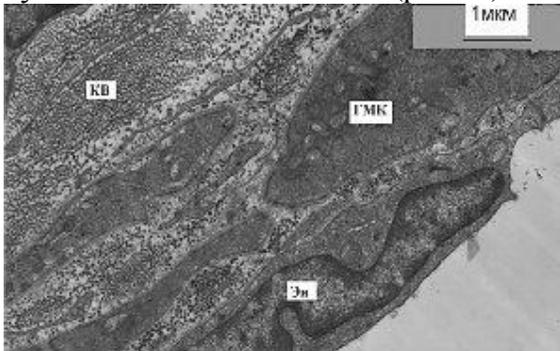


Рис. 9. Ультраструктурная организация венозной стенки через 24 часа после экспериментального моделирования тромбоза. К интима прилежат волокна фибрина. В эндотелии – мелкие везикулы.

Электронно-микроскопическое исследование внутренней эластической мембраны выявило повышение ее электронной плотности.

В средней и наружной оболочках определялись отек и очаговые мелкие кровоизлияния (рис. 10).

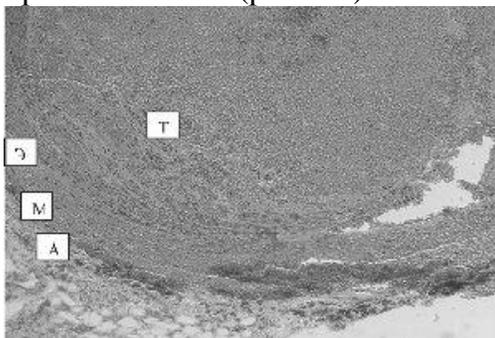


Рис. 10. Морфологические изменения венозной стенки через 24 часа после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

5-е сутки после экспериментально вызванного нарушения венозного кровотока характеризовались изменением всех слоев сосудистой стенки и развитием процессов организации тромба в месте его прикрепления к стенке вены (рис. 11). Так, в тромбе отмечалось сохранение структуры значительной части эритроцитов, среди которых четко определялись прослойки фибрина и лейкоциты, количество которых увеличивалось по направлению к месту прикрепления тромба. Наряду с этим в центральной части тромба определялись бесструктурные оксифильные участки, представленные распадающимися клеточными элементами.

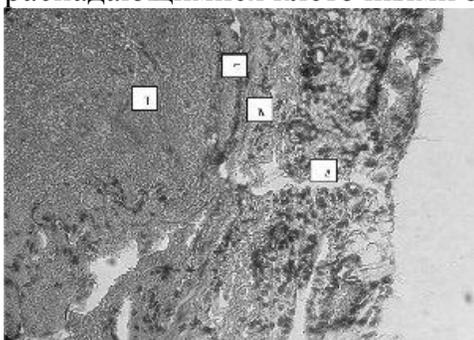


Рис. 11. Морфологические изменения венозной стенки через 5 суток после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

Внутренняя оболочка вены на большинстве участков эндотелий не содержала. Оставшиеся его фрагменты были деформированы с множеством мелких везикул, иногда крупными полостными образованиями, имело место нарушение целостности кариолеммы (рис. 12).



Рис. 12. Ультраструктурная организация венозной стенки через 5 суток тромбоза. В цито-плазме эндотелиальной клетки содержится множество везикул.

В стенке вены отмечалось утолщение мышечной и в большей степени адвентициальной оболочки. В последней определялась выраженная полиморфноклеточная воспалительная инфильтрация с наличием лимфоцитов, гистиоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, а также

увеличение между волокнами количества фибробластов. Активная пролиферация фибробластов и образование капилляров в большей степени отмечались в месте прикрепления тромба, а также в периваскулярной клетчатке.

В *vasa vasorum* адвентициальной оболочки наблюдались полнокровие и характерные изменения в виде адгезии эритроцитов к эндотелию. Мышечная оболочка венозной стенки содержала 3-5 слоев гладких миоцитов, среди которых определялись очаговые скопления клеток воспалительного ряда – лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, макрофагов.

Наружная и внутренняя эластические мембраны были выражены отчетливо (рис. 13).

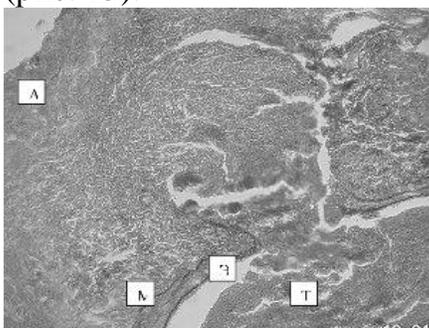


Рис. 13. Морфологические изменения венозной стенки через 5 суток после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска по Харту (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

15-е сутки после экспериментально вызванного острого тромбоза характеризовались завершением процессов организации тромба. При этом в последнем определялись сформированные анилинофильные коллагеновые волокна, между которыми обнаруживались фибробласты, фиброциты и единичные макрофаги. В толще наряду с широкой сетью капилляров тромба выявлялись выстланные вновь образованным эндотелием щели, что свидетельствовало о начале реканализации (рис. 14).

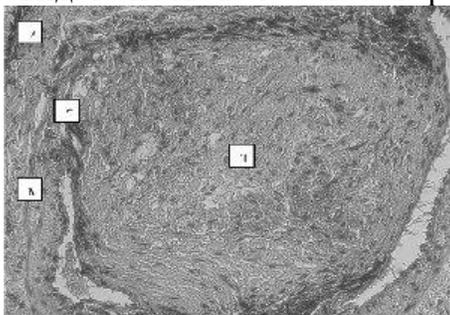


Рис. 14. Морфологические изменения венозной стенки через 15 суток после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

Наряду с этим в tunica intima отмечались выраженные деструктивные изменения значительной части эндотелиальных клеток. Внутренняя и наружная эластические мембраны были выражены отчетливо, равномерно. Мышечная оболочка стенки вены оставалась несколько утолщенной, в ней

определялся достаточно выраженный фиброз. Исследование адвентициальной оболочки также показало ее утолщение с явлениями склерозирования (рис. 15).

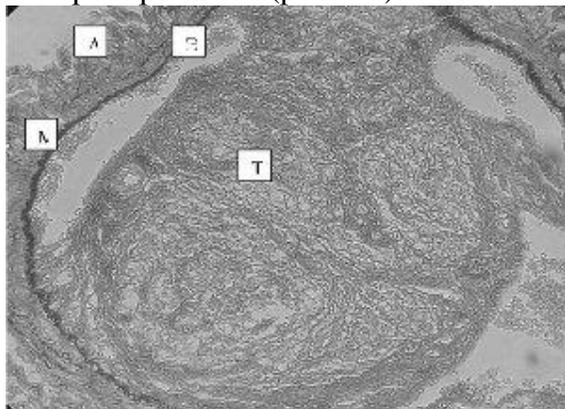


Рис. 15. Морфологические изменения венозной стенки через 15 суток после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска по Харту (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

Через 30 суток после экспериментально вызванного тромбоза в тромбе наблюдались процессы его канализации. При этом в нем имелось большое количество выстланных эндотелием широких щелей (рис. 16). стенка вены в месте прикрепления тромба была замещена достаточно плотной соединительной тканью с хорошо развитыми коллагеновыми волокнами. В средней и адвентициальной оболочках и периваскулярной соединительной ткани сохранялась очаговая умеренно выраженная клеточная продуктивная реакция.

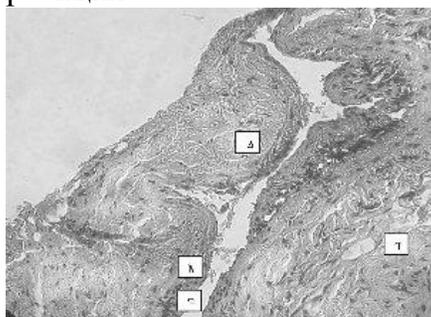


Рис. 16. Морфологические изменения венозной стенки через 30 суток после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – tunica media, А – tunica adventitia.

На 60-е сутки эксперимента в части препаратов выявлялся небольшой, занимающий от половины до трети просвета организованный тромб, представленный соединительной тканью с хорошо окрашивающимися по Гейденгайну коллагеновыми волокнами (рис. 17) и выраженной пролиферативной клеточной реакцией.

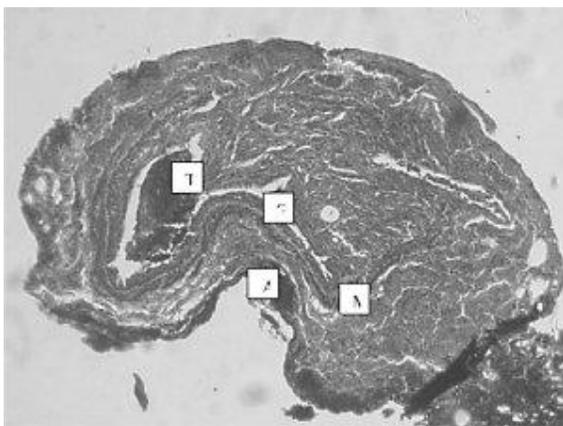


Рис. 17. Морфологические изменения венозной стенки через 60 суток после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска по Гейденгайну (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – медиа, А – адвентиция.

В нем определялись выстланные эндотелием щелевидные неправильной формы каналы (рис. 18), в большей части которых содержалась кровь.

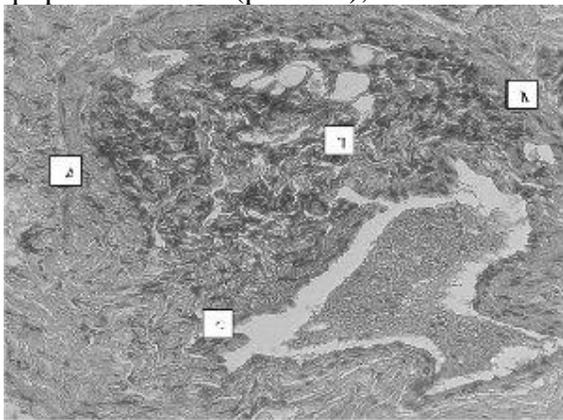


Рис. 18. Морфологические изменения венозной стенки через 60 суток после экспериментально вызванного тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином (x100). Т – тромб, Э – эндотелий, М – медиа, А – адвентиция.

Выводы

1. При остром венозном тромбозе изменениям подвергаются все компоненты сосудистой стенки. Характер и выраженность этих изменений определяются сроками после возникновения гемодинамических нарушений. Деструктивные изменения эндотелия в острую стадию сочетаются с дистрофическими изменениями гладких миоцитов средней оболочки, а также коллагеновых и эластических волокон.
2. В адвентициальной оболочке и в периадвентициальной зоне постепенно развивается мезенхимально-сосудистая реакция с пролиферацией клеток, новообразованием капилляров, формированием коллагеновых волокон. Эта реакция в последующем захватывает всю стенку вены, сопровождаясь параллельно организацией тромба.
3. Процесс организации тромба начинается с 1-ых суток и к 15-ым суткам происходит его прочная фиксация к сосудистой стенке. При этом васкуляризация тромба происходит как извне его (т.е. со стороны стенки), так и в нем самом.

4. Увеличение количества циркулирующих эндотелиальных клеток играет определенную роль в васкуляризации тромба.

Литература

1. Баешко, А.А. Послеоперационный тромбоз глубоких вен нижних конечностей и тромбоэмболия легочной артерии / А.А.Баешко. – М., 2000. – 136с.
2. Баркаган, З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – Москва, 1999. – 246с.
3. Ванков, В.Н. Строение вен / В.Н.Ванков. – Москва: «Медицина», 1974. – 208с.
4. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина. – 1982. – 304 с.
5. Динамика структурных изменений при экспериментальном флеботромбозе / Баешко, А.А. [и др.] // Здоровоохранение Беларуси. – 1999.-№ 1.-С.17-21.
6. Леонтьук, А.С. Гистология с техникой гистологических исследований / Леонтьук, А.С., Артишевский, А.А., Слука, Б.А. – Минск: Вышэйшая школа, 1999. – 356 с.
7. Лечение острых венозных тромбозов у больных с варикозной болезнью вен нижних конечностей / М.Д. Ханевич [и др.] // Вопросы общей и частной хирургии. – 2005.-№5. – С.15-18.
8. Малиновский, Н.Н. Возможна ли надежная профилактика послеоперационных венозных тромбоэмболических осложнений? / Н.Н. Малиновский // Хирургия. – 2001.-№1.-С.6-11.
9. Морфологические изменения в тромбе и стенке вены при экспериментальном флеботромбозе и тромбофлебите / Баешко, А.А. [и др.] // Морфология.-1998.-№ 5.-С.59-64.
10. Небылицин, Ю.С. Дисфункция эндотелия при экспериментальном моделировании острой венозной недостаточности / Ю.С.Небылицин, С.А.Сушков, А.П.Солодков // Вестник ВГМУ. – 2007.-№2.-С.48-56.
11. Основы гистологии и гистологической техники / Афанасьев, Ю.И., Баланчук, В.К., Ванников, Л.Л. и др.; под ред. В.Г.Елисеева, М.Я.Субботина, Ю.И.Афанасьева, Е.Ф.Котовского.-М.: Медицина.-1967.-268 с.
12. Профилактика и лечение тромбоза глубоких вен: учеб.-метод. пособие: / авт. – сост.М.Т. Воевода, А.А. Баешко – Минск: Белпринт, 2006. – 48 с.
13. Ромейс, Б. (Romeis В.) Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М.: Изд-во иностранная литература, 1954. – 718 с.
14. Савельев, В.С. Послеоперационные венозные тромбоэмболические осложнения: фатальная неизбежность или неконтролируемая опасность? / В.С.Савельев // Хирургия. – 1999.-№6.-С.60-63.
15. Суджаева, С.Г. Тромбоэмболия легочной артерии. / С.Г. Суджаева. – Минск: Белпринт, 2004. – 128 с.
16. Флебология: Руководство для врачей / Савельев, В.С., [и др.]; под ред. В.С.Савельева.-М.: Медицина, 2001.-664 с.

17. Хапалюк, А.В. Патофизиологические аспекты эффективности и безопасности применения гепаринов в лечении и профилактике тромбозов и тромбоземболий / А.В. Хапалюк // Медицина. – 2006.-№1.-С.10-15.
18. Task Force Report. Guidelines on diagnosis and management of acute pulmonary embolism. European Society of Cardiology // Europ. Heart J. – 2000 – Vol. 21, P.1301 – 1336.