



А. И. Питык,
В. П. Невзоров,
В. А. Прасол

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ КЛЕТОК АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У БОЛЬНЫХ С КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ

ГУ «Институт общей
и неотложной хирургии
им. В. Т. Зайцева НАМН
Украины», г. Харьков

© Коллектив авторов

Резюме. Электронно-микроскопическими методами исследования показано, что у больных с ангиопатией артерий нижних конечностей развиваются дистрофические нарушения эндотелиальных клеток артериальной стенки, в основе которых лежит митохондриальная дисфункция. Ангиопатия, осложнённая сахарным диабетом, характеризуется прогрессирующим дистрофическим и деструктивным внутриклеточным процессом в клетках артерий нижних конечностей. Отдельные эндотелиальные клетки артерий подвергаются тотальной деструкции. Развитие катаболических процессов косвенно подтверждается увеличением количества вторичных лизосом, локализованных вблизи пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи. Показано, что глубина и степень выраженности дистрофических и деструктивных процессов в субклеточной организации клеток артериальной стенки существенно выше в группе больных с ангиопатией, осложнённой сахарным диабетом.

Ключевые слова: ультраструктура артерий, митохондриальная дисфункция, эндотелий, КИНК, сахарный диабет.

Введение

Критическая ишемия нижних конечностей (КИНК) представляет собой самую тяжелую форму облитерирующих заболеваний периферических артерий (ЗПА) и ассоциируется с высоким риском потери конечности, летальностью, и плохим качеством жизни [7]. Эндотелиальные клетки играют большую роль в поддержании кардиоваскулярного гомеостаза. Обеспечивая физический барьер между сосудистой стенкой и просветом сосуда, клетки эндотелия секретируют медиаторы, которые регулируют агрегацию тромбоцитов, коагуляцию, фибринолиз и сосудистый тонус [1, 6]. При эндотелиальной дисфункции (ЭД) эндотелий теряет свои физиологические свойства. Уменьшая компенсаторный ответ на ишемию, формирование коллатералей и артериальное ремоделирование, тем самым ЭД способствует вазоспазму, тромбозу и прогрессированию окклюзионных поражений [2, 4]. В определении того, какие механизмы участвуют в развитии ЭД при ЗПА и в частности у больных с критической ишемией, большое значение имеет изучение ультраструктурных нарушений артериальной стенки [3].

Цель работы

Выявление особенностей ультраструктурной перестройки субмикроскопической организации клеток стенки артерий нижних конечностей больных с атеросклеротической

ангиопатией, а также больных, страдающих сахарным диабетом (СД).

Материалы и методы исследований

Материалом для исследования служили кусочки артерий, иссеченные во время оперативного вмешательства. Кусочки ткани подвергались предварительной фиксации в 2,5 % забуференном растворе глутарового альдегида в течение 4–5 часов при температуре 4° С. По окончании фиксации ткань промывали буферным раствором и помещали в 1 % забуференный раствор четырехоксида осмия на 3–4 часа для окончательной фиксации. Дегидратацию осуществляли в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Ткань пропитывали и заключали в блоки в смеси эпоксидных смол (эпон–аралдит) по общепринятым методикам. Полимеризацию блоков проводили в термостате при температуре 60 °С в течение двух суток.

Из полученных блоков, на ультрамикротоме УМТП-3 изготавливали ультратонкие среды, которые монтировали на электролитические сеточки и, после контрастирования цитратом свинца, изучали под электронным микроскопом ЭМВ–100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты исследований и их обсуждение

Электронно-микроскопическое изучение субмикроскопической организации эндотели-



альных клеток артерии нижних конечностей больных с атеросклеротической ангиопатией показало выраженные дистрофические изменения органелл, как эндотелиоцитов, так и гладких миоцитов. Ядра эндотелиоцитов имели неправильную форму и содержали гранулы деконденсированного хроматина, равномерно рассеяны в центральной области матрикса ядра. Эта область имела низкую электронную плотность. Митохондрии эндотелиальных клеток имели электронно-прозрачный матрикс. Кристы подавляющего количества митохондрий были разрыхлены, наружные мембраны митохондрий имели очаги разрушения (рис. 1а). Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума вакуолизированы, на мембранах его практически отсутствовали рибосомы. Гиалоплазма эндотелиоцитов значительно просветлена, отёчна (рис. 1б). Пластический цитоплазматический комплекс Гольджи подвержен умеренной редукции, гладкие мембраны дезорганизованы, в области их локализации комплекса Гольджи выявлялись единичные мелкие включения липидов.

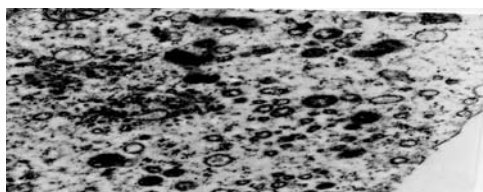


Рис. 1а. Ультраструктура эндотелиальных клеток артерий нижних конечностей больных с атеросклеротической ангиопатией. Просветление матрикса и очаговый лизис наружных мембран митохондрий. x 40 000



Рис. 1б. Ультраструктура эндотелиальных клеток артерий нижних конечностей больных с атеросклеротической ангиопатией. Расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. x 38 000

Ультраструктура гладких миоцитов, локализованных в стенке артерии нижних конечностей больных с атеросклеротической ангиопатией имела умеренно выраженные дистрофические изменения, проявляющиеся в конденсации ядерного хроматина, разрыхлении мембран митохондрий, дезорганизации гладких мембран пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи. В стенке артерий выявляются активированные фибробласты с хорошо развитыми мембранами гранулярного эндоплазматического ретикулума. Фибробласты окружены большим количе-

ством беспорядочно ориентированных коллагеновых волокон.

Электронно-микроскопическое изучение эндотелиальных клеток аорты больных с ангиопатией, осложнённой СД, показало наличие как дистрофических, так и деструктивных изменений органелл. Ядра эндотелиоцитов (рис. 2а) имели вытянутую, неправильную форму. Ядерная мембрана с очагами лизиса. Ядерный хроматин находился преимущественно в конденсированном состоянии. Цитоплазма перинуклеарного отдела эндотелиоцитов просветлена и практически не содержала органелл. В ней присутствовало небольшое количество деструктивно измененных митохондрий и мембран гранулярной эндоплазматической сети.

Митохондрии эндотелиоцитов имели неравномерно контрастированный матрикс, обладающий высокой электронной плотностью. Кристы большей части митохондрий были разрушены. Отдельные митохондрии содержали тотально лизированные кристы и имели вид вакуолей, заполненных грубо комковатой субстанцией. Наружные мембраны митохондрий с многочисленными очагами деструкции. На мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулума практически отсутствовали, связанные с ними, рибосомы. В цитоплазме выявлялось небольшое количество свободно лежащих рибосом и полисом. Гиалоплазма эндотелиоцитов имела низкую электронную плотность. Зачастую можно было наблюдать очаговый лизис мембран гранулярной эндоплазматической сети.

Пластический цитоплазматический комплекс Гольджи редуцирован и представлен отдельно лежащими, беспорядочно ориентированными, разрыхлёнными гладкими мембранами. В области расположения гладких мембран пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи определялись крупные электронно-прозрачные вакуоли, первичные и вторичные лизосомы, а также включения липидов. Цитоплазма эндотелиоцитов в отдельных клетках содержала крупные электронно-прозрачные вакуоли, характерные для агонирующих клеток. Цитоплазматическая мембрана, обращенная к току крови подвержена деструкции. Базальная мембрана извилистая имеет неравномерную толщину. Электронная плотность её варьировала в широких пределах.

Наряду с этим, в препаратах встречались эндотелиоциты с тотальной деструкцией всех внутриклеточных органелл и мембранных структур (рис. 2б). Кроме того в препаратах выявлялись эндотелиоциты, находящиеся в различных стадиях апоптоза. В цитоплазме



Рис. 2а. Ультраструктура ендотеліальних кліток артерій нижніх кінцівок хворих з ангиопатією, ускладненої СД. Інвагінація ядерної мембрани і зниження електронної щільності матрикса ядра. $\times 48\ 000$

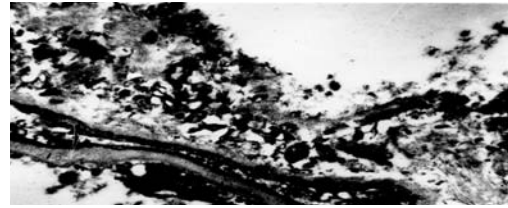


Рис. 2б. Ультраструктура ендотеліальних кліток артерій нижніх кінцівок хворих з ангиопатією, ускладненої СД. Тотальний лізис органелл. $\times 50\ 000$

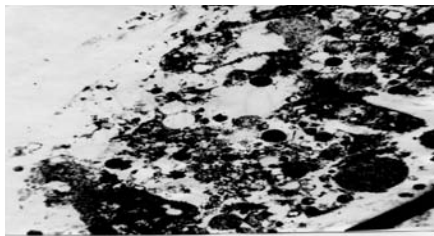


Рис. 2в. Ультраструктура ендотеліальних кліток артерій нижніх кінцівок хворих з ангиопатією, ускладненої СД. Фрагментація мембран гранулярної ендоплазматическої сітки. $\times 56\ 000$

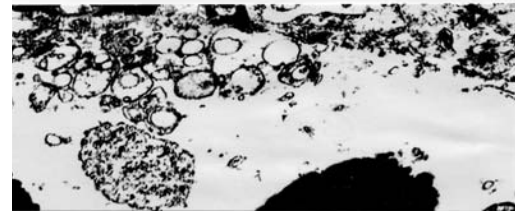


Рис. 2г. Ультраструктура ендотеліальних кліток артерій нижніх кінцівок хворих з ангиопатією, ускладненої СД. Детрит дегенеративно змінених органелл і фрагментів мембран в просвіті артерії. $\times 51\ 000$

таких ендотеліоцитів содержались деструктивно і дегенеративно зміннені мітохондрії. Наружная мембрана і кристи мітохондрій мали множинні очаги деструкції. Зачастую спостерігався тотальний лізис крист і зовнішніх мембран мітохондрій. В окремих ендотеліальних клітках гранулярний ендоплазматический ретикулум був підвержен фрагментації (рис. 2в).

Редукція пластинчатого цитоплазматического комплексу Гольджи супроводжувалася розривом і очаговим лізисом його гладких мембран. В області локалізації хаотично орієнтованих гладких мембран пластинчатого цитоплазматического комплексу Гольджи розполагались крупні вторичні лізосоми і включення ліпідів. Слой гликокалікса на цитоплазматическій мембрані, зверненої до току крові відсутствовав, а в просвіті артерії розполагались дегенеративно зміннені фрагменти органелл і мембран (рис. 2г).

В стінці артерій хворих з ангиопатією, ускладненої СД, розвивається гіперплазія гладком'язечних кліток. Змінення органелл гладких міоцитів хворих з ангиопатією, ускладненої цукровим діабетом, носили поліморфний характер. В цитоплазмі значущої частини гладких міоцитів присутствовали в великій кількості орієнтовані вздовж довгої осі актинові і міозинові мікрофіламенти. Цитоплазматическая мембрана була осміофільна і утолщена. Зачастую вона содержала мелкі очаги лізиса. Органелли

локалізувались в формі скоплень в периферических відділах цитоплазми і були оточені пучками мікрофіламентів. Мітохондрії мали розрушенні зовнішні мембрани і кристи. Встречались мітохондрії з тотально розрушеними кристами.

Ендоплазматический ретикулум розвинуто слабо. В цитоплазмі відсутствовали рибосоми і полісоми. Пластинчатий цитоплазматический комплекс Гольджи редуцирован, його гладкі мембрани дезорганізовані і деструктивно зміннені. В цитоплазмі гладких міоцитів доволі часто обнаружувались включення ліпідів. Часть гладких міоцитів содержала мелкі мітохондрії, маючі дуже високу електронну щільність і єдиничні кристи. Обращает на себе увагу очагове розривлення і очаговий лізис цитоплазматической мембрани. Вблизи неї в цитоплазмі відсутствовали кавеолы і мікропіноцитозні бульбашки, звичайно локалізуючіся вздовж цитоплазматической мембрани.

Базальна мембрана утолщена, має різну електронну щільність. В просвіті артерії обнаружувались фрагменти дегенеративно змінених органелл і мембран, включення ліпідів і конгломерати безструктурної, осміофільної субстанції. В області розрушення ендотеліального пласта артерій хворих з ангиопатією, ускладненої СД, незмінно присутствуют метаболічески активні фібробласти. Мітохондрії їх мелкі, содержат невелику кількість укорочених крист. Матрикс мітохондрій мелко



гранулярный, средней электронной плотности. В области локализации фибробластов располагались хаотически ориентированные коллагеновые и эластические волокна.

Исследование субмикроскопической организации эндотелиальных клеток артерий нижних конечностей больных с атеросклеротической ангиопатией выявило дистрофические нарушения органелл клеток артериальной стенки, свидетельствующие о снижении метаболической активности внутриклеточных мембран и органелл. Выявленные дистрофические изменения митохондрий эндотелиальных клеток артерий этой группы больных указывают на нарушение биоэнергетического обеспечения внутриклеточных синтетических и метаболических процессов. В эндотелиальных клетках развивается митохондриальная дисфункция. Расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, уменьшение, связанных с ним мембранами, рибосом и редукция пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи с дезорганизацией его гладких мембран является структурным подтверждением нарастания активности катаболических процессов. Косвенным подтверждением этого процесса является и увеличение количества вторичных лизосом и включений липидов в цитоплазме эндотелиальных клеток артерии.

Исследование субмикроскопической организации эндотелиальных клеток артерий нижних конечностей больных с ангиопатией, осложнённой СД, выявило дистрофические и деструктивные нарушения внутриклеточных мембран и органелл. Существенные деструктивные нарушения наблюдаются в митохондриях, их матрикс гомогенизируется, а кристы и наружные мембраны подвергаются очаговому лизису. Это указывает на развитие митохондриальной дисфункции, следствием которой является нарушение биоэнергетического обеспечения внутриклеточных синтетических и репаративных процессов, что структурно подтверждается вакуолизацией гранулярного эндоплазматического ретикулума, уменьшением числа связанных с ним рибосом и редукцией пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи.

Выявленная митохондриальная недостаточность существенным образом нарушает внутриклеточную биоэнергетику, что существенно снижает репаративные возможности внутриклеточных мембранных структур и органелл. Наблюдается деструкция мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и редукция пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи, что косвенно свидетельствует о снижении трансцеллюлярного

транспорта веществ и электролитов. Значительная часть гладких миоцитов подвержены деструктивным изменениям органелл, что свидетельствует о нарушении эластических свойств артерий.

Таким образом, глубина и степень выраженности дистрофических и деструктивных процессов в субклеточной организации клеток артериальной стенки существенно выше в группе больных с ангиопатией, осложнённой СД.

Дисфункция эндотелиальных клеток сопровождается гиперпродукцией факторов коагуляции, изменением реологических свойств крови, что в конечном итоге провоцирует предрасположенность к тромбозу [5]. В основе развития ЭД, на наш взгляд, ведущая роль отводится изменениям в митохондриях. Митохондриальная недостаточность, структурным выражением которой является локальный лизис наружных мембран и крист, существенным образом нарушает внутриклеточную биоэнергетику.

Морфологическая неоднородность клеток эндотелия по периферии фиброзной бляшки ведет к локальным нарушениям свертываемости крови. Через поврежденный эндотелий липопротеиды низкой и очень низкой плотности проникают в низлежащие слои артериальной стенки, где они в присутствии ионов кальция, образуют комплексы с глюкозамино-гликанами, накапливаются в макрофагах и в гладкомышечных клетках, приводят к накоплению фибронектина и коллагена, которые участвует в последующем формировании фиброзной бляшки [5]. Возникающие при этом, локальные расстройства липолитической, фибринолитической и дезагрегантной функции эндотелия усугубляют процесс липидной инфильтрации и становятся причиной микротромбообразования и отложения фибрина в очагах повреждения. В области расположения тромбов в просвете артерии обнаруживались эритроциты и фрагменты дегенеративно измененных органелл, мембран, включений липидов и бесструктурной субстанции липопротеидной природы.

Выводы

Проведенное электронномикроскопическое исследование субмикроскопической организации эндотелиальных клеток артерий нижних конечностей у больных с критической ишемией выявило нарушение метаболической активности органелл. У больных с атеросклеротической ангиопатией артерий нижних конечностей развиваются дистрофические нарушения органелл клеток артериальной стенки. Выявленные дистрофические изменения митохондрий эндотелиальных клеток артерий



этой группы больных указывают на нарушение биоэнергетического обеспечения внутриклеточных синтетических и метаболических процессов. Дистрофические изменения оргanelл гладких миоцитов нарушают эластические свойства артериальной стенки.

Ангиопатия, осложнённая СД, характеризуется прогрессированием дистрофических и деструктивных внутриклеточных процессов в клетках артерий нижних конечностей. Отдельные эндотелиальные клетки артерий имели тотально разрушенные оргanelлы. Развитие катаболических процессов косвенно подтверждается увеличением количества вторичных лизосом, локализованных вблизи пластинчатого цитоплазматического комплекса

Гольджи. Глубина и степень выраженности дистрофических и деструктивных процессов в субклеточной организации клеток артериальной стенки существенно выше в группе больных с ангиопатией, осложнённой СД.

Таким образом, электронно-микроскопическими исследованиями выявлено, что в артериях нижних конечностей у больных с критической ишемией развиваются изменения субмикроскопической архитектоники эндотелиальных клеток, в результате чего возникает ЭД. В результате чего у этих больных развиваются локальные расстройства свертывающей системы крови в виде гиперкоагуляции, прогрессирования ишемии и тромбозов дистальных артериальных сегментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атеросклероз, сахарный диабет и автономная иннервация органов сердечно-сосудистой системы / И. П. Дуданов, П. В. Пигаревский, Д. Э. Коржевский [и др.] // Мед. Акад. Журн. — 2012. — Т. 12, № 2. — С. 19-27.
2. Нагорнев В. А. Сахарный диабет и атеросклероз / В. А. Нагорнев, А. Д. Денисенко // Мед. акад. журн. — 2008. — Т. 8, № 1. — С. 159-167.
3. Струков А. И. Патологическая анатомия / А. И. Струков, В. В. Серов. — М.: «Медицина». — 1979. — 528 с.
4. Функция эндотелия и морфофункциональное состояние клеток крови в бассейнах ишемизированных конечностей при различных видах хирургического лечения больных облитерирующим атеросклерозом / И. И. Кательницкий, С. А. Плескачев, М. А. Буриков и др. // Клиническая практика. — 2011. — № 1. — С. 4-46.
5. Deedwania P. C. Diabetes is a vascular disease: the role of endothelial dysfunction in pathophysiology of cardiovascular disease in diabetes / P. C. Deedwania // Cardiol. Clin. — 2004. — Vol. 22, №4. — P. 505-509.
6. Endothelial Dysfunction in Diabetes. The role of reparatory mechanisms / A. Avogaro, M. Albiero, L. Menegazzo [et al.] // Diabetes Care. — 2011. — Vol. 4, Suppl. 2. — S. 285-S290.
7. Inter-Society Consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). / L. Norgren, W. R. Hiatt, J. A. Dormandy [et al.] // Eur J. Vasc. Endovasc. Surg. — 2007 — Vol. 33. — P. S1– S70.



УЛЬТРАСТРУКТУРНІ
ПОРУШЕННЯ КЛІТИН
АРТЕРІЙ НИЖНІХ
КІНЦІВОК У ХВОРИХ
З КРИТИЧНОЮ ШЕМІЄЮ

*O. I. Pityk, V. P. Nevzorov,
V. O. Prasol*

Резюме. Електронно-мікроскопічними методами дослідження показано, що у хворих з ангиопатією артерій нижніх кінцівок розвиваються дистрофічні порушення ендотеліальних клітин артеріальної стінки, в основі яких лежить мітохондріальна дисфункція. Ангіопатія, ускладнена цукровим діабетом, характеризується прогресуванням дистрофічних і деструктивних внутрішньоклітинних процесів в клітинах артерій нижніх кінцівок. Окремі ендотеліальні клітини артерій піддаються тотальній деструкції. Розвиток катаболічних процесів побічно підтверджується збільшенням кількості вторинних лізосом, локалізованих поблизу пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі. Показано, що глибина і ступінь вираженості дистрофічних і деструктивних процесів у субклітинному організації клітин артеріальної стінки істотно вище в групі хворих з ангиопатією, ускладненої цукровим діабетом.

Ключові слова: *ультраструктура артерій, мітохондріальна дисфункція, ендотелій, КІНК, цукровий діабет.*

ULTRASTRUCTURAL
DISORDERS OF THE LOWER
LIMBS ARTERIES IN
PATIENTS WITH CRITICAL
LIMB ISCHEMIA

*A. I. Pityk, V. P. Nevzorov,
V. A. Prasol*

Summary. Electron microscopic methods study shows that in patients with angiopathy of lower limb arteries develop the dystrophic disorders of endothelial cells of the arterial wall, which are based on mitochondrial dysfunction. Angiopathy complicated by diabetes, is characterized by progression of dystrophic and destructive intracellular processes in the cells of lower limb arteries. Separate artery endothelial cells undergo total destruction. Development of catabolic processes is indirectly confirmed by the increase in the number of secondary lysosomes localized near lamellar cytoplasmic Golgi complex. It is shown that the depth and severity of degenerative and destructive processes in subcellular organization of cells of the arterial wall is significantly higher in patients with angiopathy, complicated by diabetes.

Key words: *ultrastructure of arteries, mitochondrial dysfunction, endothelium, CLLI, diabetes.*