

© И.С. Сесорова, Т.В. Лазоренко, 2009  
УДК 611.018.74.001.5

*И.С. Сесорова и Т.В. Лазоренко*

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО МОНОСЛОЯ ПОСЛЕ РЕЭНДОТЕЛИАЛИЗАЦИИ УЧАСТКА КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ ГРУДНОГО ПРОТОКА

Кафедра анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии им. Е.Я. Выренкова  
(зав. — проф. С.И. Катаев) Ивановской медицинской академии; e-mail: irina-s3@yandex.ru

На стандартной модели криодеструкции изучали особенности репаративной регенерации эндотелия грудного протока кошки. Материал брали через 12 ч и на 1-, 2-е и 3-и сутки после повреждения и анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Показано восстановление эндотелиального пласта грудного протока на 3-и сутки за счет миграции и пролиферации клеток края зоны криодеструкции. Степень восстановления ткани оценивали, используя топологические и информационные параметры. Получены данные о неполном завершении процесса регенерации на 3-и сутки; выявлено пограничное состояние клеточной системы и возможность нарушения процесса реорганизации эндотелиального пласта. Таким образом, информационные показатели можно использовать как дополнительные критерии оценки динамики процессов, состояния и функционирования клеточных систем.

**Ключевые слова:** грудной проток, эндотелий, регенерация, криоповреждение, структурно-информационный анализ.

Травматичность применяемых в настоящее время методов лимфотерапии делает необходимым исследования закономерностей восстановления компонентов сосудистой стенки лимфатических коллекторов. В особенности это справедливо в отношении эндотелия, нарушение структурной организации которого может стать причиной патологических изменений стенки сосуда [3, 10]. Эндотелий, являясь сложной многокомпонентной тканевой системой, чутко реагирует на любые воздействия (локальную гемодинамику, повреждающие факторы и др.) изменением целого ряда параметров, характеризующих как отдельные клетки, так и эндотелиальный пласт (ЭП). При этом ключевую роль в нормальном функционировании сосудистой стенки играет структурная организация клеточной системы в целом, оценить которую можно с позиции теории информации, позволяющей получить интегральные критерии состояния биологической системы в норме и во время изучаемого процесса [1, 2, 5, 11].

Таким образом, с целью оценки состояния эндотелиального монослоя межклапанного сегмента грудного протока (ГП) после реэндотелиализации криоповреждения был использован структурно-информационный анализ вновь образованного ЭП и интактного монослоя.

Материал и методы. На стандартной модели криодеструкции [9] комплексом электронно-микроскопических методов, включающих сканирующую электронную микроскопию нативных (СЭМ НП) и импрегнированных нитратом серебра (СЭМ ИП) препаратов, в соответствии с «Правилами

проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) изучали закономерности регенерации эндотелия ГП кошки. Эксперимент проведен на 24 животных обоего пола массой от 3 до 5,5 кг. Материал брали через 12 ч, на 1-, 2-е и 3-и сутки от начала опыта. Метод СЭМ НП использовали для выявления изменений рельефа эндотелиальной поверхности ГП в процессе репаративной регенерации. Препараты для СЭМ НП готовили следующим образом. После перфузионной фиксации ГП 2,5% раствором глутарового альдегида экспериментальный участок сосуда иссекали, промывали фосфатным буфером (рН 7,2), затем дополнительно фиксировали 1% раствором четырехокси осмия в течение 1 ч, вновь отмывали фосфатным буфером и обрабатывали 1% раствором таниновой кислоты 40 мин. Далее образцы отмывали в дистиллированной воде и обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне. Обезвоженные препараты высушивали путем перехода через критическую точку из жидкой кислоты в установке НСР-2 (Hitachi, Япония), монтировали на столики и напыляли платиной в аппарате JFC-1100 (Hitachi, Япония). С целью визуализации межклеточных границ эндотелиоцитов (ЭЦ) после перфузионной фиксации ГП отмывали в течение 1 мин 5% раствором глюкозы. Затем сосуд последовательно перфузировали: 0,15% раствором  $\text{AgNO}_3$  (0,3 мин), 5% раствором глюкозы (1 мин), смесью 3%  $\text{CoBr}_2$  и 1%  $\text{NH}_4\text{Br}$  (0,5 мин), 5% раствором глюкозы (1 мин) и 2,5% раствором глутарового альдегида (1 мин). Участки ГП иссекали, разрезали вдоль оси сосуда, после чего образцы готовили для СЭМ по стандартной методике. Анализ объектов проводили в микроскопе S-570 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ. На электронных микрофотографиях с препаратов импрегнированных нитратом серебра, измеряли длину, ширину, периметр, площадь поверхности ЭЦ и определяли топологические параметры — среднюю степень связности клеток в пласте тканевой организации эндотелия области межклапанного сегмента интактного ЭП ГП и вновь образованного после крио-

деструкции. Морфометрические параметры были в дальнейшем использованы в информационном анализе клеточных систем эндотелиального монослоя в норме и после восстановления повреждения. Анализировали следующие информационные показатели:  $H$  — информационная энтропия [1, 5];  $H_{\max}(Q)$  — максимальная информационная емкость системы (максимальная энтропия системы);  $S$  — абсолютная организация системы;  $R$  — относительная организованность системы, или коэффициент избыточности;  $h$  — относительная энтропия, или коэффициент сжатия информации [1, 5, 6];  $D$  — коэффициент морфологической эквивокации, который отражает разницу показателей относительной энтропии двух клеточных систем — в условиях нормы и патологии и может быть вычислен как разность коэффициентов избыточности информации этих систем. В данном случае коэффициент эквивокации вычисляли для нормальных и вновь образованных после повреждения ЭЦ, принимая во внимание достоверность различий между их морфологическими показателями.

Для получения информационной характеристики морфологической системы необходимо определить число учитываемых показателей и вероятность их нахождения на разных этапах изучаемого процесса. При выборе показателей необходимо обратить внимание на их принадлежность к одному уровню организации, а также на их возможные взаимосвязи [11]. В качестве таких параметров мы выбрали: длину, ширину, периметр и площадь поверхности ЭЦ. Далее мы разделили всю исходную совокупность морфометрических характеристик ЭЦ пласта на группы методом кластерного анализа в программе Statistica 6.0. Число полученных групп показателей приняли за количество возможных состояний (позиций) клеточной системы изучаемого участка.

На основании полученных данных, можно определить максимальную энтропию, которая показывает, на сколько может возрасти сложность системы, и ее фактическую (информационную) энтропию в изучаемом участке.

Максимальная информационная емкость, или максимальная энтропия, определяется логарифмом по основанию «2» от числа состояний системы:

$$H_{\max}(Q) = m \log_2 n, \quad (1)$$

где  $m$  — число компонентов в системе;  $n$  — число возможных позиций.

Информационная энтропия вычисляется как сумма произведений вероятностей различных состояний системы на бинарный логарифм этих состояний, взятая с обратным знаком.

$$H = - \sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i, \quad (2)$$

где  $H$  — информационная энтропия;  $p_i$  — вероятность нахождения системы в определенном состоянии.

В нашем случае мы приняли, что изучаемый нами эндотелиальный монослой может находиться в каждом из возможных состояний, количество которых ( $n$ ) было определено методом кластерного анализа, с одинаковой степенью вероятности, т.е.  $p_i = 1/n$ .

Получив значения максимальной и информационной энтропии системы, можно вычислить производные информационные показатели.

Под абсолютной организацией системы понимают реализованную в ней неопределенность. Чем ниже показатель неопределенности состояний, тем выше организованность системы:

$$S = H_{\max} - H. \quad (3)$$

Относительная организованность системы, или коэффициент избыточности, показывает долю информации, которая является избыточной по сравнению с оптимальной, но обеспечивает надежность биологической системы:

$$R = (1-h) \times 100\%. \quad (4)$$

Относительная энтропия, или коэффициент сжатия, показывает насколько система «загружена» информацией от максимально возможной величины и может использоваться для оценки развития процесса во времени:

$$h = \frac{H}{H_{\max}}. \quad (5)$$

Коэффициент морфологической эквивокации (ненадежности) позволяет оценить тенденцию развития процесса и прогнозировать его:

$$D = R_{\text{норма}} - R_{\text{пр}}. \quad (6)$$

Результаты исследования. ЭП контрольных участков в зонах ламинарного лимфотока представляет собой монослой сильно уплощенных, преимущественно удлинённых или полигональных клеток, ориентированных вдоль оси потока лимфы (рис. 1). Степень связно-

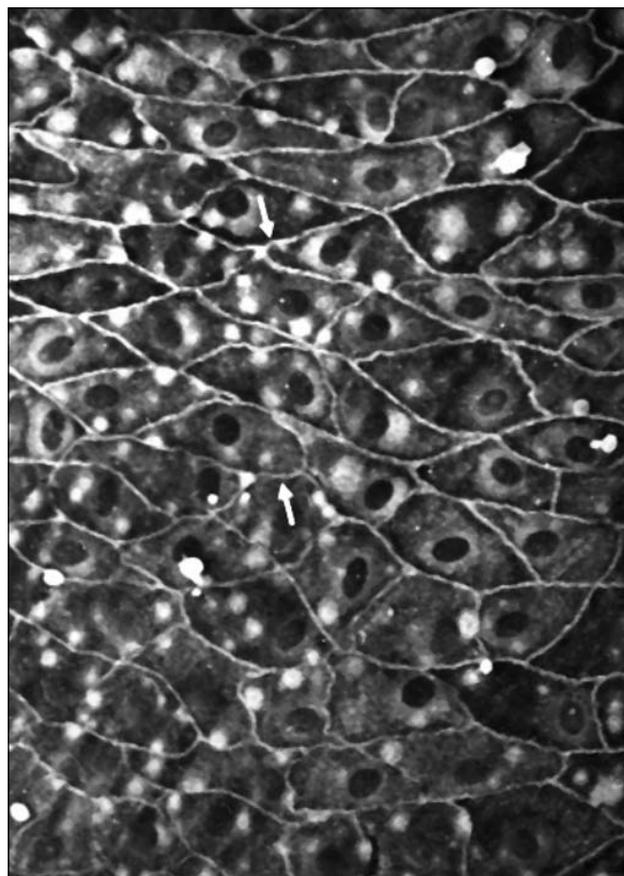


Рис. 1. Эндотелиальный монослой межклапанного сегмента грудного протока кошки в зоне ламинарного лимфотока.

Стрелки — межклеточные границы. Сканирующая электронная микроскопия. Импрегнация нитратом серебра. Ув. 1100.

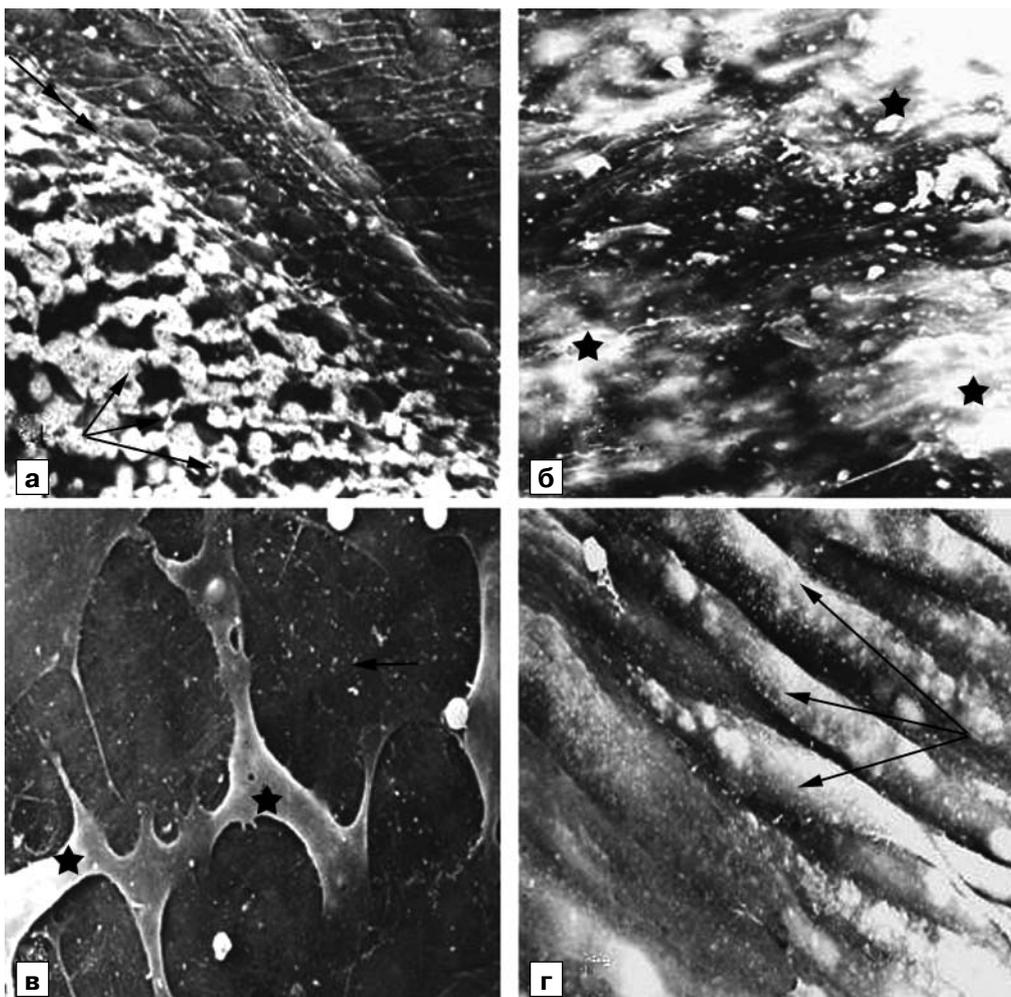


Рис. 2. Зона криодеструкции грудного протока кошки.

а — эндотелиальный монослой через 12 ч после повреждения; сдвоенная стрелка — граница зоны повреждения; стрелки — межклеточные контакты поврежденных клеток; б — зона криодеструкции через 12 ч после повреждения, звездочки — фибрин; в — зона повреждения через 24 ч после криодеструкции; звездочки — сокращающиеся и слущивающиеся эндотелиальные клетки; стрелка — волокна субэндотелия; г — веретеновидные клетки (стрелки) мигрирующего эндотелия на краю повреждения через 24 ч после криодеструкции. а — сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) препарата, импрегнированного нитратом серебра; б — г — СЭМ нативных препаратов. Ув.: а — 1000; б — 300; в, г — 2000.

сти клеток в пласте —  $5,98 \pm 0,03$ , т.е. около 56% клеток контактируют с шестью соседними. Информационные параметры представлены следующими показателями: максимальная энтропия — 3,58 бит; информационная энтропия — 2,22 бит; абсолютная организация системы — 1,36; относительная организованность системы — 37%; относительная энтропия — 0,62.

Проведенные нами исследования процесса репаративной регенерации ЭП показали, что ключевыми механизмами восстановления эндотелия межклапанного сегмента ГП после криоповреждения являются миграция и пролиферация клеток края зоны повреждения (рис. 2). Через 3 сут после криоаппликации дефект ЭП, равный 3 мм, полностью реэндотелизируется.

В результате морфологического анализа ЭП зоны криодеструкции через 3 сут после повреж-

дения выявлены изменения средней площади поверхности ЭЦ на 54% по сравнению с таковой в интактном монослое. Большинство клеток имели полигональную форму, между тем встречалось большое количество округлых, клиновидных, треугольных клеток в виде флажка (рис. 3). Анализ гистограммы распределения значений связности отдельных ЭЦ показал преобладание клеток с пентагональной симметрией — 40,21%. Вновь образованный ЭП имел низкую степень связности клеток, которая составила  $5,69 \pm 0,04$ . Численная плотность клеток в пласте почти в 2 раза превышала контрольные значения.

Информационный анализ показал, что в клеточной системе вновь образованного ЭП в 1,33 раза увеличивается показатель максимальной энтропии и в 1,83 раза — значение информационной энтропии. Доля избыточной информации



Рис. 3. Эндотелиальный монослой межклапанного сегмента грудного протока кошки в зоне повреждения через 3 сут после криодеструкции.

Стрелка — межклеточные границы; звездочка — клетка треугольной формы; треугольники — клетки в виде флажка. Сканирующая электронная микроскопия. Импрегнация нитратом серебра. Ув. 750.

составляет 15%, а коэффициент сжатия информации увеличивается и составляет 0,85; коэффициент морфологической эквивокации — 22%.

**Обсуждение полученных данных.** Информационный анализ интактного эндотелиального монослоя показал его принадлежность к сложным детерминированным системам, параметры которых находятся в жестких функциональных зависимостях [2]. Эту особенность можно использовать при подборе математического аппарата для изучения ЭП в норме. Доля избыточной информации в клеточной системе ЭП невелика, что может свидетельствовать о лабильности систем управления и быстром формировании ответной реакции на внешние воздействия. Тем не менее, этой информации достаточно, чтобы обеспечить высокую упорядоченность системы (в том числе расположение клеток в пласте). Действительно, мы получили быструю ответную

реакцию клеток на повреждение ЭП в эксперименте. Уже через 12 ч после криодеструкции обнаруживается распластывание краевых ЭЦ с формированием у них структурированной ламеллоплазмы. Восстановление целостности эндотелиального монослоя происходит уже на 3-и сутки после криодеструкции, что значительно быстрее, чем при аналогичных повреждениях артерий и вен [4, 9, 12]. Однако морфометрические и топологические параметры ЭП в зоне реэндотелизации существенно отличаются от показателей интактного монослоя. Анализ информационных параметров выявил увеличение показателя максимальной энтропии, т.е. после восстановления повреждения клеточная система становится более сложной. Показатель информационной энтропии сдвигается в сторону максимальной энтропии, что свидетельствует об увеличении разнородности клеточных элементов. Данный факт может рассматриваться как признак снижения адаптационных и компенсаторных возможностей вновь образованного ЭП. На месте повреждения происходит снижение упорядоченности расположения клеток в пласте, на что указывает относительная энтропия, или коэффициент сжатия информации. Это подтверждается низкой степенью связности клеток в зоне реэндотелизации. Признаком дезорганизации является значительное, в 2,5 раза, уменьшение доли избыточной информации, которая составляет структурный резерв системы. Это также можно трактовать как неблагоприятный признак. Однако данный показатель остается достаточно высоким, т.е. система способна к восстановлению и нормальному функционированию. Тем не менее, структурная перестройка вновь образованного монослоя существенна, о чем мы можем судить по величине информационной морфологической эквивокации, а клеточная система ЭП переходит в разряд вероятно-детерминированной [7, 8]. Эти данные свидетельствуют не только о неполном завершении процесса регенерации на 3-и сутки после повреждения, но и о существующей вероятности ее перехода к новому уровню, т.е. ЭП может не восстановить свои параметры до уровня интактного. Это может произойти при дополнительном воздействии каких-либо факторов, например, повышенной локальной лимфоцитности.

Таким образом, используя структурно-информационный анализ, мы выявили пограничное состояние клеточной системы вновь образованного после криодеструкции монослоя. Полученные данные свидетельствуют о достаточном адаптационном резерве клеточной системы для восстановления ее структурной организации. Однако

существует вероятность нарушения процесса реорганизации ЭП, что может стать причиной патологических изменений стенки сосуда.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М., Медицина, 1980.
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
3. Банных С.И., Сесорова И.С., Миронов А.А. мл. и др. Клапанный аппарат и тканевая организация грудного протока. Морфология, 1996, т. 109, вып. 1, с. 40–50.
4. Вялов С.Л. и Миронов А.А. Механизмы репаративной регенерации венозного эндотелия. Бюл. экспер. биол., 1988, т. 105, № 3, с. 376–379.
5. Лазько А.Е., Лазько М.В. и Ярошинская А.П. Структурно-информационный анализ биологических систем. Астрахань, Изд-во «Астраханский университет», 2007.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., Высш. школа, 1990.
7. Леонтьев А.С. Структурное разнообразие как критерий системной характеристики процессов морфогенеза. Морфология, 1996, т. 119, вып. 2, с. 67.
8. Лернер А.Я. Принципы самоорганизации. М., Мир, 1996.
9. Рехтер М.Д. и Миронов А.А. Репаративная регенерация эндотелия брюшной аорты крысы при криодеструкции. Цитология и генетика, 1990, т. 32, № 2, с. 122–127.
10. Сесорова И.С., Сесоров В.В., Полянская Л.И. и Миронов А.А. Клеточный механизм регенерации эндотелия грудного протока после криодеструкции. Ангиол. сосуд. хир., 1995, № 2, с. 89.
11. Славин Н.Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях. М., Медицина, 1989.
12. Bannich S.I., Bannich G.N., Sesorova I.S. and Mironov A.A. Regeneration of the endothelium of thoracic duct. Microscopia Electronica, 1993, v. 14, supp. 1, p. 199–200.

Поступила в редакцию 24.02.09  
Получена после доработки 19.05.09

#### ENDOTHELIAL MONOLAYER EVALUATION AFTER RE-ENDOTHELIZATION OF THE AREA OF THE THORACIC DUCT CRYODESTRUCTION

*I.S. Sesorova and T.V. Lazorenko*

Using the standard cryodestruction model, the peculiarities of reparative regeneration were studied in cat thoracic duct endothelium. Material was collected 12 hours, 1, 2 and 3 days after the injury and was analyzed using scanning electron microscopy. The restoration of the endothelial layer was shown to be completed by day 3 due to cell migration and proliferation at the margin of cryodestruction zone. The degree of tissue regeneration was evaluated using the topological and informational parameters. The results demonstrated the imperfect completion of regeneration process by day 3; the borderline state of the cellular system was detected together with the possibility of the disturbance of endothelial lining reorganization process. Thus, the informational parameters may be used as the complementary criteria for the assessment of the processes, cellular system state and functioning.

**Key words:** *thoracic duct, endothelium, regeneration, cryodestruction, structural informational analysis.*

Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographical Anatomy, Ivanovo State Medical Academy.