https://doi.org/10.17116/patol20188005151

Метод получения препарата монослоя эндотелиальных клеток интимы кровеносных сосудов

Н.А. СОЛОВЬЕВА

Кафедра патологической анатомии Первого Московского государственного университета им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Описана методика получения препаратов монослоя эндотелиальных клеток интимы сосудов, пригодная для изучения различных морфологических процессов. Для получения качественных многоклеточных препаратов рекомендуется предварительно удалять лишнюю ткань снаружи сосуда и освобождать интиму; разбираются способы высушивания поверхности и отрыва эндотелиальных клеток. Приводится рисунок, окрашенный по Романовскому—Гимзе, выявление маркера эндотелия — фактора VIII и включений *Chlamydia pneumoniae* в цитоплазме эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: пленчатые препараты, эндотелий, кровеносные сосуды, атеросклероз.

A method for preparation of an endothelial cell monolayer sample from the blood vessel intima

N.A. SOLOVYEVA

Department of Pathoanatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

The paper describes the procedure to prepare endothelial cell monolayer samples from the vascular intima, which is suitable for studying various morphological processes. To obtain high-quality multicellular specimens, it is recommended to preliminarily remove excess tissue from the outside of the vessel and to free the intima; ways to dry the surface and to separate endothelial cells are examined. The paper gives the figures of specimens stained by the Romanowsky-Giemsa method and identifies factor VIII, an endothelial marker, and *Chlamydia pneumoniae* inclusions in the cytoplasm of endothelial cells.

Keywords: film drugs, endothelium, blood vessels, atherosclerosis.

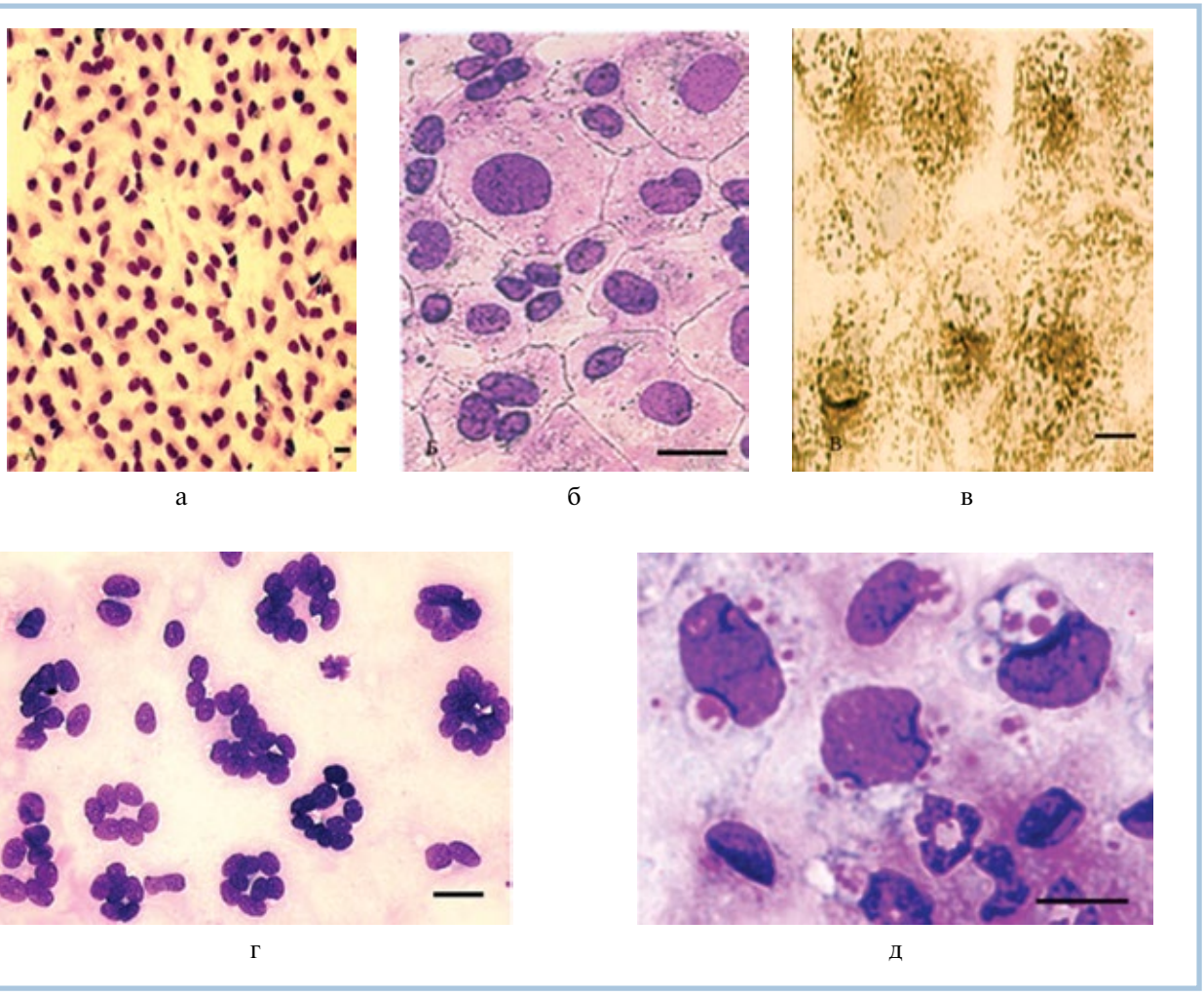
Внутренняя выстилка сосудов состоит из монослоя эндотелиальных клеток (ЭК), которые образуют большую совокупную площадь и массу. У человека массой тела 70 кг эндотелий занимает общую площадь 720 м^2 и содержит примерно 6,3·10^{13} клеток. Масса эндотелия составляет 1,5—2 кг и соответствует, как видно, массе печени человека [1]. Основная масса эндотелия локализована в капиллярах, и только небольшая его доля покрывает остальные сосуды. Эндотелий сосудов образует простую структуру, но в функциональном отношении это сложный орган, который регулирует такие разные биологические процессы, как гемостаз, фибринолиз, воспаление, кровяное давление, метаболизм липопротеинов и ангиогенез. Поэтому изменения одной или более физиологических функций эндотелия сосудов приводят к его дисфункции. Мы изучаем морфологию эндотелия при различных атеросклеротических формах поражения коронарных сосудов и аорты. Рутинные морфологические методы исследования эндотелия оказались недостаточными или вовсе непригодными, так как имеют дело с поперечными срезами сосудов, на которых эндотелий представлен в виде тонкой полоски.

Цель исследования — разработать методику получения с интимы сосудов препаратов монослоя ЭК, пригодных для изучения эндотелия при различных его состояниях.

Морфологические методы изучения структуры эндотелия сосудов можно разделить на два типа: поперечные срезы и препараты монослоя ЭК. Признано, что методы поперечных срезов являются малоинформативными и могут использоваться лишь в качестве дополнительных. Естественно, исследовать всю (en face) эндотелиальную поверхность сосуда или значительную их площадь можно только с помощью препаратов монослоя ЭК. К настоящему времени основные сведения о структуре эндотелия при атеросклерозе получены именно этими методами, среди них можно назвать метод импрегнации серебром цитоплазматических границ эндотелия [2], метод слепков [3], методику отрыва интимы от сосуда с помощью охлажденного льда до –30 °С [4], сканирующую электронную микроскопию. Почти все перечисленные методы сложны технически, затратны экономически и по времени исполнения. Мы не встретили работы по изучению целиком пласта эндотелия сосудов с применением самого простого, быстрого, с высокой разрешающей способностью, легко выполнимого и экономически дешевого предлагаемого метода. Возможно, это связано с тем, что в литературе существует мнение, что после смерти с поверхности крупных сосудов невозможно получить отпечаток с интимы ввиду наличия на поверхности полимеризованного фибрина [5]. Это заставило нас ис-

© Н.А. Соловьева, 2018

Соловьева Надежда Анатольевна — канд. мед. наук, доц. каф. патологической анатомии; e-mail: Nadsva@gmail.com



Метод получения препарата монослоя эндотелиальных клеток интимы кровеносных сосудов.

а — на непораженных атеросклерозом участках аорты многочисленные обычной формы эндотелиальные клетки; б — обычной формы эндотелиальные клетки при большом увеличении; в — специфический маркер эндотелия — антиген фактора VIII (фактор Виллебранда) в виде многочисленных мелких гранул в цитоплазме эндотелиальных клеток; г — почти полное замещение эндотелиальных клеток обычной формы гетерогенным многоядерным гигантским эндотелием над атеросклеротической фиброзно-жировой бляшкой; д — в цитоплазме эндотелиальных клеток около ядер многочисленные включения *Chlamydia pneumoniae* (в полостях вакуолей содержатся округлые разных размеров хламидийные тельца).
Окраска по Романовскому—Гимзе. Измерительные линии: а — 20 мкм, б, д —10 мкм, в, г — 5 мкм.

кать новые подходы к приготовлению препаратов монослоя ЭК. Метод получения с поверхности крупных сосудов препаратов монослоя ЭК имеет ряд нюансов, выполнение которых способствует получению качественных препаратов. Однако для их освоения необходимо затратить некоторое время на подготовку сосудов и технику получения собственно препаратов монослоя ЭК.

Мы исследовали аутопсийный материал, полученный до 48 ч после смерти от 46 пациентов обоего пола в возрасте 35—85 лет. На вскрытии забирали коронарные и сонную артерии, аорту и легочную артерию. Всю ткань с наружной стороны срезали, фрагменты сосудов помещали в ванночку с забуференным солевым раствором и проводили несколько смен жидкости для удаления крови. Затем сосуды вскрывали продольно, дополнительно ополаскивали в жидкости и визуально оценивали общую степень поражения атеросклерозом. Вырезали куски площадью 2—3 см² с трех областей: непораженные участки, жировые полоски и фиброзно-жировые бляшки. С вырезанных кусков почти всегда удаляли адвентицию сосудов для выравнивания поверхности. Для этого лапчатым пинцетом захватывали интиму и медию, а адвентицию полностью удаляли другим пинцетом. Приготовленные фрагменты сосудов осторожно ополаскивали в забуференном солевом растворе до полного (визуальный) отхождения крови, интима при этом приобретает цвет слоновой кости. Фрагмент помещали на фильтровальную бумагу. Лишнюю воду с интимы можно удалить тремя способами: с помощью вентилятора, при естественном высыхании или марлевой салфеткой. Мы применяем в основном последний способ. На руку в резиновой перчатке с фильтровальной бумагой кладется фрагмент сосуда, на интиму накладывается марля, сложенная вчетверо, и осторожно прижимается другой рукой. Как показала практика, качество препаратов, полученное этим

способом и сушкой вентилятором, аналогично. Однако высушивание марлей — более быстрый и надежный способ. Следует отметить, что если недосушить препарат, то с влажной поверхности интимы можно вообще не получить клеток, если пересушить, то получаются артифициальные клетки с резко вытянутыми тонкими ядрами. Момент достижения оптимальной точки высушивания находится опытным путем сотрудником каждый раз при приготовлении препаратов. После высушивания готовили препараты монослоя ЭК. Следует подчеркнуть, что от правильно выполненных действий прямо зависит качество препарата — это количество клеток, целостность межэндотелиальных связей и эндотелиального пласта в целом. В тех случаях, когда отпечатки получают с ровной поверхности с непораженных участков и жировых полосок, предметное стекло осторожно, без нажима прикладывается к поверхности интимы и обратно быстрым движением отрывается пласт эндотелия. Если нажим слишком большой, то межклеточные связи легко разрываются и наблюдаются диссоциированные, одиночные эндотелиальные клетки или почти бесклеточный препарат. Поскольку фрагменты сосудов большие, особенно аорты, занимающие всю рабочую поверхность предметного стекла, то под стеклом всегда остаются пузырьки воздуха, хорошо видимые при косом освещении, и, естественно, с этих участков эндотелий не попадает в отпечаток. Оставшиеся участки эндотелия снимаются при повторном получении отпечатка, при этом качество препарата может быть сравнимо с первым. Получение препарата с фиброзно-жировой бляшки отличается от вышеописанного способа. В связи с тем что фиброзно-жировая бляшка выбухает над поверхностью интимы, отпечаток можно получить часто лишь движением предметного стекла, похожим на движение пресс-папье. В данной работе никаких специфических, специальных или иных требований к качеству предметного стекла мы не предъявили, поэтому использовали обычные обезжиренные (1:1 — эфир, спирт 96°) предметные стекла. Препараты высушивали на воздухе, фиксировали спиртом, окрашивали по Романовскому—Гимзе или другим методом и заключали в бальзам (полистерол). Мы часто оставляли препараты на второй день для высушивания и затем проводили соответствующую окраску. Препараты в хорошем состоянии сохраняются несколько лет. Остается нерешенным вопрос о феномене прилипания эндотелиальных клеток к стеклу, который представляет значительный интерес. В литературе отсутствуют сведения об адгезии монослоя (ЭК) к предметному стеклу.

Как известно, например, к здоровому эндотелию не могут прикрепляться тромбоциты, поскольку он представляет собой неадгезивную поверхность. Возможным объяснением этого является то, что мембраны ЭК состоят из жидкокристаллических липидов, а эти поверхности, как было показано Е.Ю. Васильевой и соавт. [6], не адгезивны для тромбоцитов. Возможно, повышение адгезивности эндотелия может быть обусловлено усиленной продукцией им адгезивных гликопротеинов (лектины) и других веществ, которые включаются в состав фибриновой пленки, в норме покрывающей эндотелий со стороны просвета сосуда, фиксацией на эндотелиальных клетках хематтрактантов, впоследствии взаимодействующих со специфическими рецепторами на лейкоцитах, усилением экспрессии на эндотелиоцитах рецепторов к иммуноглобулину G и фрагменту комплемента C3b, что способствует фиксации иммунных комплексов, а через них — лейкоцитов, несущих рецепторы к иммуноглобулину G и C3b.

Исходя из цели исследования, препараты монослоя эндотелия можно изучать различными методами, учитывая при этом особенности предварительной обработки для каждой рекомендуемой прописи. Для иллюстрации некоторых результатов, полученных предлагаемым методом, приводим **рисунок**.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Burrig K, Hort W. Das koronare Endothelmuster beim Menschen. *Z Kardiol.* 1989;78(Suppl. 6):100-104.
2. Poole JC, Sanders AG, Florey HW. The regeneration of aortic endothelium. *J Pathol Bacteriol.* 1958;75(1):133-143.
3. Levesque MJ, Liepsch D, Moravec S, Nerem RM. Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis.* 1986;6(2):220-229.
4. Чумаченко П.В. Иммунопероксидазное исследование антигенов интимы аорты и других крупных артерий. *Архив патологии.* 1989;51(10):77-80. [Chumachenko PV. Immunoperoxidase study of intima antigens of the aorta and other large arteries. *Arkhiv patologii.* 1989;51(10):77-80. (In Russ.)].
5. Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J.* 1988;60(6):459-464.
6. Vasilieva EYu, Shpector AV, Raskuragev AB, Lekochmacher SS, Bespalko IA. Platelet function in patients plasma lipid levels in patients with stable and unstable angine pectoris *Am J Cardiol.* 1991;68(9):959-966. https://doi.org/10.1016/0002-9149(91)90418-k

Поступила 12.02.18