

Гурин

*На правах рукописи*

**ГУРИН ЯРОСЛАВ ВАЛЕРЬЕВИЧ**

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
МИКРОСОСУДИСТОГО ОКРУЖЕНИЯ  
ПРИ ВТОРИЧНОМ АНГИОГЕНЕЗЕ**

**03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук



Москва – 2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации»

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,  
профессор

**Павлович Евгений Ростиславович**  
*ГОУ ВПО Российский государственный  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова*

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор

**Козлов Валентин Иванович**  
*ГОУ ВПО Российский  
университет дружбы народов*

Доктор медицинских наук,  
профессор

**Карелина Наталья Рафаиловна**  
*ГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная  
педиатрическая медицинская академия*

Ведущая организация:


ГОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет

Защита состоится 26 ноября 2009 г. В 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.08 медицинского факультета ГОУ ВПО Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан '23' октября 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент

 О.Б. Саврова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Сердечно-сосудистая система играет важнейшую роль в обеспечении нормального течения всех процессов жизнедеятельности организма. Это диктует необходимость обстоятельного изучения ангиогенеза и механизма переноса веществ через стенки сосудов. Данный процесс осуществляется обязательно при участии эндотелия, без учета состояния которого нельзя говорить с достоверностью о проницаемости сосудистых стенок. Кровеносные сосуды – не просто эластические трубки, или разнокалиберные шланги, индифферентные к жизнедеятельности органов и тканей. Они сложно устроены, активно участвуют в кровообращении, отвечают за циркуляторный гомеостаз (Жданов Д.А., 1964; Куприянов В.В. с соавт., 1975, 1983; Козлов В.И., 1976, 1981; Караганов Я.Л. с соавт., 1982; Сапин М.Р., 1974, 1982; Чернух А.М. с соавт., 1975 и др.)

Основные фундаментальные данные об ультраструктурных изменениях, сопровождающих новообразование сосудов при регенерации и перестройку межклеточного вещества соединительной ткани были получены относительно давно (Серов, Шехтер 1985; Виноградов, 1981; Ross 1975, Гурина с соавт., 1985).

С того момента сменилась научная парадигма, в частности – основная модель регенерации (Kirsner and Eaglstein, 1993; Linares, 1996; Sicard et al., 1998; Yannas, 2001; Schultz et al., 2003), появились работы о роли ангиогенеза в заживлении ран (М.Р. Сапин, 2005), получила распространение теория тканевой ниши (Gabbiani, 2004), миофибробластов (Charonniere, 2006), расширились представления о роли стволовых клеток и клеток-предшественников, а так же обновилась теория дифферона для фибробластического ряда.

Работами школы академика В.В. Куприянова (1975) и его учеников: В.И. Козлова (1981, 1994) и Я.Л. Караганова (1981) установлено, что обменные процессы в органах зависят от деятельности трех компонентов системы микроциркуляции: транспортных потенциалов кровеносных микрососудов, наличия и состояния тканевых каналов в интерстиции и резорбирующих свойств лимфатических микрососудов (Карелина Н.Р. с соавт., 1984).

В связи с тем, что большая часть заболеваний человека сопровождается нарушением гомеостаза, связанного с нарушением транспортных потенциалов микрососудов из-за повреждения их стенок, изучение структуры вновь образованных сосудов на клеточном и субклеточном уровне является вполне обоснованным. А определение особенностей взаимодействия на ультраструктурном уровне растущих микрососудов с клетками окружающих тканей в аспекте формирования системы микроциркуляции с восстановлением исходного уровня обмена веществ является новым.

Изучение развития микрососудов при различных видах воздействий, в том числе – в эксперименте, на ультраструктурном уровне с применением электронномикроскопического исследования, является актуальным.

В настоящее время необходимо выяснить не только подробную ультраструктурную организацию мельчайших новообразованных сосудов и изменение окружающих клеток соединительной ткани, но и их влияние на этапы роста сосудов.

Работа посвящена решению актуальной задачи фундаментальной медицины – выяснению особенностей ультраструктурной организации растущих микрососудов в аспекте их взаимодействия с окружающими клетками и нормализацией тканевого гомеостаза.

В рамках выполнения работы методами световой и электронной микроскопии с применением морфометрии было произведено исследование структуры клеток соединительной ткани в норме и в эксперименте. В частности изучено пространственное расположение, темпы и характер роста новых сосудов.

### **Цель исследования**

Изучение морфофункциональных характеристик различных клеток соединительной ткани при вторичном ангиогенезе и выяснение их роли в становлении барьерно-транспортных свойств вновь сформированных микрососудов.

### **Задачи исследования**

1. Методами световой и электронной микроскопии изучить структуру клеток соединительной ткани вокруг материнских микрососудов области лимба глаза кролика.
2. Определить с применением электронномикроскопических методов структурно-функциональные характеристики клеток соединительной ткани на разных уровнях растущих новообразованных микрососудов при вторичном ангиогенезе.
3. Провести сравнительный анализ морфофункциональных характеристик клеток соединительной ткани и их роли в обеспечении роста микрососудов и восстановлении их транспортных свойств при вторичном ангиогенезе.

### **Научная новизна**

Впервые выделены пять зон роста микрососудов при вторичном ангиогенезе в эксперименте, в зависимости не только от строения стенки сосуда, но и от клеточного окружения.

Новым является изучение характера и темпов роста сосудов на разных стадиях их роста и ремоделирования в зависимости от клеточного окружения.

Впервые описан состав клеточного микроокружения вокруг растущих микрососудов по зонам роста, установлен его полиморфизм в зависимости от зоны растущего микрососуда.

Изучена ультраструктура клеток и межклеточного вещества ткани вокруг растущих микрососудов.

Работа показывает возможные пути влияния на управление восстановлением дефектов соединительной ткани через воздействие на микроокружение растущих сосудов.

Определены: 1) зависимость барьерно-транспортных свойств эндотелиальной выстилки различных зон растущего сосуда при вторичном ангиогенезе в эксперименте и 2) степень дифференцированности и зрелости эндотелиоцитов в зависимости от состава клеточного микроокружения вокруг растущих сосудов.

### **Научно-практическая значимость**

Проведенные исследования позволяют связать современные теории развития и строения вновь образованных сосудов и соединительной ткани с их ультраструктурными изменениями в ходе основных этапов регенерации.

Сравнительный морфологический анализ структурно-функциональных характеристик клеток соединительной ткани, сопровождающих новообразованные сосуды на разных стадиях развития при вторичном ангиогенезе позволяет уточнить фундаментальные аспекты регенерации сосудов и влияния на темпы их роста клеточного микроокружения.

Полученные в результате исследования данные позволят разработать способы влияния на восстановление нарушенного тканевого гомеостаза и воздействовать на его регуляцию при воспалении, гипоксии, некрозе и регенерации. Эти данные могут служить основой для терапии повреждений, сопряженных с восстановлением дефекта и являться отправной точкой при разработке методов терапии для ускорения процессов новообразования сосудов в соединительной ткани различной локализации.

Работа решает задачу качественной оценки управляемого восстановления дефектов соединительной ткани путем влияния на микроокружение растущих сосудов.

Результаты исследования являются оригинальным вкладом в развитие морфологии сосудов микроциркуляторного русла и внедрены в учебный процесс кафедры морфологии РГМУ, кафедры гистологии лечебного и кафедры гистологии педиатрического факультетов РГМУ, кафедры гистологии Смоленской государственной медицинской академии Росздрава.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В растущем сосуде на 9 сутки роста выделено 5 различных зон:
  - зона относительно дифференцированного эндотелия;
  - зона переходного эндотелия от непрерывного к фенестрированному типу;
  - зона фенестрированного эндотелия (максимального развития транспортных коммуникаций);
  - зона недифференцированного эндотелия;
  - зона эндотелиобласта (верхушки ростка).

2. Клеточный состав вокруг растущих микрососудов отличается полиморфизмом, в зависимости от зоны растущего микрососуда.
3. Барьерно-транспортные свойства эндотелиальной выстилки различных зон растущего микрососуда, а также степень дифференцированности и зрелости эндотелиоцитов зависят от микрососудистого окружения.
4. При асептическом воспалении в окружающие микрососуды ткани мигрируют клеточные элементы крови, которые изменяют структуру плотной соединительной ткани роговицы и ее матрикс, тем самым создавая условия для роста новых сосудов.

### **Апробация результатов**

Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на:

- Всероссийской научной конференции «Гистологическая наука России в начале 21 века: итоги, задачи, перспективы» – 22-24 октября 2003г., г. Москва;
- V международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» – 20-21 ноября 2008 г., Москва;
- Международном форуме «Интегративная медицина–2009», Москва, 5-7 июня 2009 г.;
- VI съезде анатомов, гистологов и эмбриологов России – Саратов, 23-25 сентября 2009 г.;
- совместном заседании кафедры морфологии медико-биологического факультета, кафедры гистологии лечебного факультета, кафедры гистологии педиатрического факультета, кафедры ЛОР болезней педиатрического факультета ГОУ ВПО Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова и подразделений Российского кардиологического научно-производственного комплекса – Москва, 16 октября 2009 г.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 2 в центральной печати.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 132 страницах машинописного текста. Работа содержит 1 таблицу, 2 диаграммы, иллюстрирована 31 рисунком, в том числе гистологическими и электронными микрофотографиями. Список литературы содержит 240 источников литературы (67 отечественных и 173 иностранных авторов).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Объектом исследования служили клетки соединительной ткани, окружающие материнские микрососуды области лимба глаза кроликов и клетки, расположенные вблизи новообразованных кровеносных микрососудов, растающих в собственное вещество роговицы глаза после ее ожогового повреждения, на девятые сутки роста на всем протяжении роста.

Исследование выполнено на 19 кроликах – самцах породы Шиншилла весом 1,5-2 кг, согласно этическим нормам (разрешение локального этического комитета РГМУ № 90). Были выделены две группы животных:

1. контрольная группа – 5 животных, у которых изучали клетки соединительной ткани, расположенные вблизи микрососудов лимба и их взаимосвязь и взаимоотношения со стенками кровеносных микрососудов. Эта группа включала три подгруппы: 1 животное – интактное – полный контроль; 2 кролика взяты для исследования после введения внутривенно маркера микрососудов - пероксидазы из хрена через 1 минуту и у 2 кроликов материал для исследования взят через 30 минут после введения этого же маркера;
2. экспериментальная группа включала 14 животных, у которых проводили изучение клеточного окружения вокруг новообразованных микрососудов, растающих в собственное вещество роговицы глаз кроликов на девятые сутки роста после нанесения ожога азотнокислым серебром на центр роговицы одного из глаз кроликов на всем протяжении роста, второй глаз был контрольным. Эта группа состояла также из трех подгрупп, контрольная включала 2 животных и две подгруппы с внутривенным введением маркера – каждая по 6 животных. В одной подгруппе изучаемых животных введение растительной пероксидазы осуществляли за 1 минуту до забора материала, а во второй подгруппе животных – за 30 минут до энуклеации глаз. У каждого животного изучали обе роговицы, то есть был исследован материал 38 роговиц. В то же время каждую роговицу рассекали на 16 сегментов, в связи с чем общее число изученных кусочков тканей с сосудами составило 608 блоков. Распределение животных по группам исследования и видам воздействий представлено в таблице 1.

Эксперимент: Все манипуляции с животными проводились под общей анестезией Рометаром (Спофа) (2 мг препарата на 1 кг веса животного). На центр роговицы глаза кролика наносили ожог кристаллом азотнокислого серебра диаметром около 1 мм в течение 5 минут. Затем стерильным физиологическим раствором омывали глаз.

На девятые сутки после ожога под рометаровой анестезией в ушную вену кролика вводили растительную пероксидазу (25 мг на 100 г массы тела животного), для визуализации сосудов лимба или вросших в роговицу новообразованных кровеносных микрососудов.

Взятие материала было стандартизировано: под анестезией рометаром производили префиксацию роговицы *in situ* путем накапывания в течение трех минут охлажденного ( $t=4^{\circ}\text{C}$ ) 2,5% глютарового альдегида, приготовленного на 0,1 М фосфатном буфере с  $\text{pH}=7,4$ . Затем вводили шприцем в верхнее и нижнее веко, а также в заглазничное пространство тот же раствор после чего производили энуклеацию глаз. Животных забивали путем избыточного введения препарата Zoletil-100 (Virbac).

Таблица 1.

Распределение животных по видам воздействия

| Группы животных   | Контрольная                     | Экспериментальная<br>(ожог $\text{AgNO}_3$ –9 сутки<br>роста)  |
|---|---------------------------------|--|
| Вид воздействия   |                                 |  |
| Контроль-интактные животные<br>(без введения пероксидазы)               | 1 животное<br>(2 роговицы)      | 2 животных<br>(4 роговицы)                                     |
| Введение растительной<br>пероксидазы за 1 минуту до<br>взятия материала | 2 животных<br>(4 роговицы)      | 6 животных<br>(6 роговиц – с ожогом и<br>6 роговиц – контроль) |
| Введение растительной<br>пероксидазы за 30 минут до<br>взятия материала | 2 животных<br>(4 роговицы)      | 6 животных<br>(6 роговиц – с ожогом и<br>6 роговиц – контроль) |
| Общее число животных  | 5 животных                      | 14 животных  |
| <b>ИТОГО:</b>   | <b>19 животных (608 блоков)</b> |  |

Методы исследования:

*Световая микроскопия.* После извлечения глаза вырезали роговицу с захватом 2 мм склеры и в таком виде фиксировали в растворе 2,5 % глютарового альдегида еще 1,5 часа. Затем рассекали роговицу на 16 сегментов, отступя от края лимба в сторону центра роговицы оставляли 4-5 мм ткани и кусочки роговицы с области лимба размером в длину до 6-7 мм и шириной 3-4 мм и в таком виде проводили дальнейшую обработку образцов.

Далее шла отмывка от фиксатора в 0,1 М растворе фосфатного буфера с  $\text{pH}=7,4$  в течение часа, 4 раза меняли раствор через 15 минут. Затем образцы монтировали на столике замораживающего микротомы и производили удаление поверхностного эпителия и заднего эпителия роговицы.

После получения кусочков роговицы толщиной 400-500 мкм осуществляли проведение реакции на выявление в сосудах лимба и новообразованных сосудах растительной пероксидазы, которая включала несколько этапов:

- преинкубацию при комнатной температуре 30 минут в растворе трис –  $\text{HCl}$ -диаминобензидин-тетрагидрохлорида с  $\text{pH}=7,4$ ;
- инкубацию в термостате при  $t=37^{\circ}\text{C}$  в течение часа в том же растворе с добавлением нескольких капель 1% перекиси водорода;



- отмывку от инкубационной среды при комнатной температуре в дистиллированной воде в трех порциях по 5 минут в каждой.

После проведения реакции и визуализации сосудов лимба или вросших в роговицу новообразованных кровеносных микрососудов, проводили под лупой фоторегистрацию образцов и выделение кусочков ткани, содержащих 1-3 отдельных ростка или сегментов лимба с одной капиллярной петлей, при этом размер кусочков ткани уменьшался от 1-2 мм в ширину до 3-4 мм в длину.

Дальнейшая обработка материала включала: дофиксацию в течение часа в растворе четырехоксида осмия по методу G. Millonig (1962), отмывку от осмия в течение часа в четырех порциях 0,1 М раствора какодилатного буфера с  $\text{pH}=7,4$ ; дополнительную пропитку в течение часа при комнатной температуре в 1% растворе таниновой кислоты на какодилатном буфере  $\text{pH}=7,4$  (таниновая кислота дополнительно окрашивала материал базальных мембран, практически не видимый при обычной методике подготовки материала вокруг новообразованных сосудов, а также клеточные мембраны, позволяя изучать *maculae et zonulae occludentes* контактирующих клеток); отмывку от излишков таниновой кислоты в течение 5 минут в 1% растворе  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , приготовленном на какодилатном буфере с  $\text{pH}=7,4$ ; промывку в какодилатном буфере с  $\text{pH}=7,0$  три раза по 5 минут; дегидратацию в спиртах восходящей концентрации и ацетоне; пропитку и заключение образцов в плоских блоках с полной смесью смол, содержащей Araldit «М» и Araldite «Hardener» в равных частях, с добавлением Araldite «Acselevator» 1/5 части от смеси смол и «Dibutilftalat» в пределах 1/10 части от смеси смол; с последующей полимеризацией в этой смеси в течение двух суток в термостате при  $t=56^\circ \text{C}$ . Биопсийные образцы ориентированно размещали в капсулах для полимеризации. На микротоме Hïstorange (ЛКБ, Швеция) с блоков получали полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм и окрашивали их толуидиновым синим. Световая микроскопия осуществлена на лабораторном микроскопе (МБИ – 15У) укомплектованном окулярной морфометрической сеткой.

*Метод топологического анализа.* Нами был использован и усовершенствован метод топологического анализа, разработанный Э.А. Лебедевым с соавторами (1982) для изучения сосудов модулей микроциркуляторного русла. Мы применили указанный метод в изучении клеточного микроокружения вокруг дефинитивных (материнских) сосудов лимба глаза и вблизи новообразованных кровеносных микрососудов в роговице на всем протяжении ростков с четкой детализацией распределения клеток в зависимости от зоны изучаемого новообразованного сосуда.

Для этого на тотальных препаратах изучали визуализированные микрососуды лимба глаза и новообразованные микрососуды роговицы, выделяя участки ткани с 1-2 растущими сосудами.

Далее при подготовке образцов для электронномикроскопического изучения, осуществляли под контролем полутонких срезов затачивание на ультрамикротоме LKB-III пирамиды с растущим микрососудом, который изучали на всем протяжении с клеточным микроокружением: от места его

отхождения от материнского (родительского) микрососуда лимба до верхушки с шагом в 15-20 мкм.

На каждом уровне делали полутонкие срезы и затачивали пирамидку для получения серийных ультратонких срезов. Вначале снимали обзор растущего сосуда с окружающими клетками на малом увеличении, затем сам растущий сосуд и крупным планом клетки, его окружающие, а после этого детали строения эндотелиоцитов, выстилающих новообразованный микрососуд

Таким образом, наше усовершенствование топического (топологического) метода анализа заключается в последовательности рассмотрения одного растущего сосуда не только на всем его протяжении, но и в использовании изучения зон роста последовательно на тотальном препарате, полутонких срезах, электронном микрофотографировании на малых увеличениях с получением по сути полутонких срезов высокого качества и детальным исследованием особенностей ультраструктурной организации как самого новообразованного сосуда и всех компонентов его стенки, так и клеточного микроокружения и деталей их ультраструктурной организации.

*Электронная микроскопия.* С помощью топического метода на светооптическом уровне под лупой выделяется одна капиллярная петля лимба глаза кролика или один-два растущих в роговице кровеносных микрососуда, которые ориентируются и заливаются в смесь смол.

Затем подготовленный образец под контролем полутонких срезов, толщиной 1 мкм, полученных на пирамиде ЛКВ-III, затачивается в виде пирамиды и на ультрамикротоме изготавливаются ультратонкие срезы, которые монтируются на медные и палладиевые опорные сеточки.

Дальнейшая подготовка ультратонких срезов к исследованию – их двойное контрастирование при комнатной температуре в 5 % растворе уранил-ацетата не менее 20 минут и в растворе цитрата свинца не менее 5 минут по методу R. Reynolds (1963).

Просмотр подготовленных ультратонких срезов и их фоторегистрацию осуществляли на электронном микроскопе Hitachi – HU-12A при ускоряющем напряжении 75 кВ и электронном микроскопе Carl Zeiss LEO-912 AB.

*Морфометрические методы изучения материала.* Количественный анализ использовали в соответствии с алгоритмом, разработанным для количественной характеристики обменных микрососудов в лаборатории электронной микроскопии ЦНИЛ 2-го МОЛГМИ имени Н.И. Пирогова (Гурина О.Ю., Караганов Я.Л., 1984). Оценка достоверности полученных морфометрических показателей осуществлялась по t-критерию Стьюдента.

Среди многообразия критериев оценки ультраструктуры обменных микрососудов, нами были использованы следующие: определение площади просвета микрососуда ( $S_l = 16 \times N_l \div K^2$ ), определение площади эндотелиальной выстилки ( $S_e = 16 \times N_e \div K^2$ ), определение площади поперечного сечения микрососуда ( $S_v = S_l + S_e$ ), где  $N_l$  - число точек измерительной тест - решетки, приходящихся на просвет микрососуда;  $N_e$  - число точек измерительной тест - решетки, приходящихся на эндотелиальную выстилку микрососуда;  $K$  -

увеличение на экране электронного микроскопа или на фотопластинке в тысячах крат.

Используемая нами тест-решетка состояла из совокупности параллельных линий с нанесенными на них точками и была предложена Я.Л.Карагановым с соавторами (1976). Шаг решетки и расстояние между линиями составляли 10 мм. Для повышения точности измерение на одном контуре проводили трижды при повороте каждый раз тест – решетки на 120°.

## **Результаты исследования и их обсуждение.**

*Морфо-функциональная характеристика кровеносных микрососудов лимба и их клеточного окружения.* Кровеносное микрососудистое русло лимба глаз кроликов образовано артериолами, прекапиллярами, капиллярами, посткапиллярами и венулами с типичным для этих микрососудов строением (Волосок Н.И., 1980; Гурина О.Ю., 1985).

Электронномикроскопическое изучение микрососудистого русла лимба глаза показало, что капилляры в лимбе глаз кроликов представлены замкнутыми петлевидными формациями.

Это сосуды с эндотелием непрерывного типа, в которых транспорт веществ осуществляют в основном микровезикулы, при этом трансэндотелиальных каналов в виде соединенных микровезикул практически нет, межклеточные контакты между соседними эндотелиальными клетками плотные с наличием пятен и зон облитерации, в виде стыков, наложений, интердигитаций и в транспорте белков также не участвуют. Эти данные согласуются с исследованиями Shameena Bake et al., (2009), которые установили, что микрососуды и капилляры с эндотелием непрерывного типа в норме не проницаемы для белка, выход белка в интерстиций зависит от изменения функционального состояния эндотелия и изменения межэндотелиальных контактных комплексов.

Изучение интерстиция, окружающего кровеносные микрососуды лимба глаза кролика показало, что он образован рыхлой соединительной тканью, содержащей пересекающиеся пучки коллагеновых волокон, в меньшей степени присутствуют единичные эластические и ретикулярные волокна. Клеточный состав представлен фиброцитами, плазматическими, адвентициальными клетками. Вблизи посткапилляров и венул иногда встречаются тучные клетки. Необходимо отметить наличие плотных соединений между эндотелиоцитами и перицитами, отростки последних прободают базальную мембрану микрососудов, формируя контакты с эндотелиальными клетками. Именно наличие этих контактов ограничивает ангиогенные потенции микрососудов лимба глаза кролика. Подобные результаты получили E. Iivanainen et al. (2009), которые установили, что подавление активности перицитов приводит к продолжению роста сосудов.

*Морфофункциональная характеристика новообразованных сосудов роговицы глаз кроликов на девятые сутки роста и их микроокружения.* Наше изучение ростков на всем их протяжении с изготовлением послойных серийных

полутонких и ультратонких срезов позволило выделить на протяжении роста пять различных зон, характеризующихся отличием в строении эндотелия, формирующего стенку микрососуда, различным состоянием базальной мембраны, перицитов; барьерно-транспортных свойств сосудистой стенки и клеточного окружения вокруг новообразованных сосудов в различных зонах роста. Качественные наблюдения были подтверждены количественными исследованиями.

*Первая зона* – зона относительно дифференцированного эндотелия занимает по протяженности от 120 до 150 мкм, является местом отхождения новообразованного сосуда от материнского сосуда области лимба.

Микрососуд этой области содержит эндотелий непрерывного типа и имеет практически такое же строение, что и материнский сосуд, то есть его стенка сформирована двумя-тремя эндотелиальными клетками.

Межклеточные контактные комплексы этой зоны роста представлены плотными контактами, содержащими пятна облитерации, практическим отсутствием, по сравнению с материнскими сосудами, зон облитерации. В этой связи микрососуды содержат те же транспортные коммуникации, что и посткапилляр или венула материнского сосуда.

В эндотелиоцитах этой зоны транспорт белка осуществляют связанные и свободные микровезикулы, заполненные хлопьями пероксидазы, то есть барьерно-транспортные свойства этой зоны роста не отличаются от транспортных свойств материнских сосудов лимба.

Микрососудистое окружение в этой зоне роста также не отличается большим разнообразием и аналогично микрососудистому окружению в лимбе. Встречаются фибробласты, адвентициальные клетки и перициты, которые формируют контактные комплексы с эндотелием новообразованных сосудов.

Таким образом, наличие в этой зоне роста перицито-эндотелиальных контактов приводит к полному ограничению ангиогенной активности эндотелия, несмотря на сохранение подвижности клеточной мембраны эндотелиоцитов, которая формирует выросты и с люменальной и с базальной поверхности. Полученные нами данные согласуются с исследованиями Crocker D. et al. (1970) о контактном торможении движения эндотелиальных клеток вследствие задержки периода интерфазы контактирующими перицитами.

*Вторая зона* – переходная зона от эндотелия непрерывного типа, формирующего капилляры в зоне относительно дифференцированного эндотелия, к фенестрированному эндотелию сосудов следующей зоны роста.

Эта зона находится на расстоянии 150–220 мкм от материнского сосуда и занимает по протяженности от 70 до 100 мкм. Сосуд в этой зоне имеет две-три начинающиеся истончаться эндотелиальные клетки с уплощенной ядросодержащей зоной клеток, в которой ядро меньше выступает в просвет сосуда, также наблюдается заметное уменьшение органелл общего назначения в цитоплазме клеток, тогда как микрофиламенты формируют мощные пучки вокруг ядра. Базальная поверхность клеточной мембраны эндотелиальных клеток образует выросты, выступающие в окружающую ткань в местах

отсутствия базальной мембраны. Базальный слой микрососудов изменяется: базальная мембрана видна, как состоящая из одного электронноплотного слоя, второй электронноплотный слой прерывистый или отсутствует, перicyты не всегда удается обнаружить и они практически не формируют контакты с эндотелиальной выстилкой.

В цитоплазме клеток появляются специфические эндотелиальные тельца Вейбеля-Паладе, которые окружены клеточной мембраной и в матриксе содержат микротрубочки. Чаще всего эти тельца расположены возле ядер эндотелиоцитов, но встречаются и рядом с транспортными коммуникациями эндотелиальных клеток – трансэндотелиальными каналами, и межклеточными контактными комплексами. Очевидно, что появление и увеличение содержания в цитоплазме эндотелиоцитов специфических эндотелиальных телец объясняется тем, что они выделяют в цитоплазму клеток гистамин, который взаимодействуя с цитоскелетом клеток, вызывает их сокращение и тем самым приводит к ослаблению связей между соседними эндотелиоцитами. В последующем это способствует повышению подвижности эндотелиоцитов и облегчает их миграцию в направлении стимулятора роста. На подобное действие гистамина указывали Aizawa S. et al. (1973), Kawamura J. et al., (1974), Maupin P. A. Pollard T. (1983), и в недавних исследованиях подтвердили Марченко А.В. с соавт. (2008), установив, что гистамин вызывает гиперпроницаемость микрососудов, активируя эндотелиальную киназу.

Транспортные каналы в эндотелиоцитах этой зоны по – сравнению с предыдущей зоной более разнообразны: встречаются трансэндотелиальные каналы, состоящие из слившихся двух, реже трех микровезикул; межэндотелиальные контактные комплексы практически все щелевидные, только иногда они содержат пятна облитерации. Таким образом, барьерно-транспортные функции растущего микрососуда в этой зоне более выражены, как за счет транспорта белка трансвезикулярными каналами, так и за счет выхода белка в интерстиций через щелевидные контактные комплексы не содержащие пятен слияния контактирующих мембран.

Заслуживает внимания тот факт, что именно в этой зоне мы наблюдали активный выход в интерстициальную ткань клеток крови: макрофагов, лимфоцитов, нейтрофилов, базофилов, эозинофилов.

Несмотря на это, микрососудистое окружение в этой зоне довольно скудно: наблюдаются в основном макрофаги, разрушающие интерстиций – коллагеновые волокна межклеточного вещества роговицы. В собственном веществе роговицы на некотором расстоянии от ростка мы наблюдали отростки фибробластов. Иногда стенка растущего микрососуда в этой зоне была окружена как муфтой эндотелиобластом, предохраняющим растущий новообразованный сосуд от повреждающих факторов. Редкое обнаружение тучных клеток, плазмочитов, вокруг ростка этой зоны объясняется тем, что эти клетки мигрируют по ходу растущего сосуда к его вершукше.

*Третья зона* – зона фенестрированного эндотелия с истончением эндотелиальной выстилки и максимальным развитием всех транспортных коммуникаций.

Эта зона находится на расстоянии 220–320 мкм от материнского сосуда, достаточно протяженная и занимает от 350 до 600 мкм.

Сосудистая стенка в этой области ограничена, как правило, двумя сильно истонченными эндотелиальными клетками с многочисленными фенестрами, вначале единичными, затем переходящими в цепочки.

Трансвезикулярные каналы образованы только одной микровезикулой, из-за истончения эндотелиоцитов сосудистой стенки. В цитоплазме клеток значительно снижается содержание органелл общего назначения, тем не менее, довольно часто встречаются расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети, что свидетельствует о повышенной секреторной активности эндотелиальных клеток этой зоны.

Межклеточные контакты между соседними эндотелиоцитами все щелевидные или открытые.

В отношении базального слоя картина зависит от метода окраски: при использовании таниновой кислоты при приготовлении препаратов не только клеточные мембраны лучше определяются на электроннограммах, но также видно, что в базальном слое есть два прерывистых электронноплотных слоя. Характерно, что при любом способе приготовления препаратов наблюдается резкое истончение и прерывистость базальной мембраны в области расположения фенестр. Без использования таниновой кислоты видно, что базальная мембрана полностью прерывистая, двух листков нет, наблюдается нежный прерывистый хлопьевидный материал, особенно вблизи фенестр, который по структуре напоминает хлопья пероксидазы. В этой зоне вокруг эндотелиальных клеток практически отсутствуют перicyты.

Барьерно-транспортные свойства в этой зоне выражены максимально: в транспорте белка принимают участие все транспортные коммуникации растущего микрососуда: открытые межклеточные контакты, микровезикулярные каналы, фенестры.

Микрососудистое окружение в зоне фенестрированного эндотелия отличается полиморфизмом. В непосредственной близости от эндотелиальных клеток растущего микрососуда, особенно в области формирования фенестр, чаще всего встречается эндотелиобласт, который в виде полумуфты прикрывает наиболее истонченную стенку растущего микрососуда. Он выполняет несколько функций по отношению к растущему микрососуду: защищает стенку растущего микрососуда, синтезирует белки, идущие на построение базального слоя. Макрофаг, находящийся поблизости, осуществляет фагоцитоз и лизис интерстиция с распадающимися коллагеновыми фибриллами. Поражает частота обнаружения в этой зоне тучных клеток, содержащих в своей цитоплазме гранулы разной степени дегрануляции. По мнению Fraser R. (1980), тучные клетки не только являются «одноклеточными железами», но и обладают мультипотентной секреторной

деятельностью. Полиморфизм гранул, наблюдаемых нами в тучных клетках, расположенных вдоль растущего капилляра подтверждает, что из них активно выделяются вещества, оказывающие влияние на проницаемость растущих сосудов, на подвижность их клеточной мембраны и, в конечном счете, на миграционные потенции растущего эндотелия. Вне всякого сомнения гепарин и гистамин, выделяемые тучными клетками, активируют как ферментативную систему эндотелиоцитов (Ширинский В. П., 2006), так и воздействует на цитоскелет эндотелиальных клеток (Bogatcheva N.V., 2007). Все это приводит к сокращению эндотелиоцитов, появлению открытых контактных комплексов. По мнению Сенатовой И.Д. (1974), согласующемуся с результатами Schayer R. (1968), гистамин обладает сильным вазотропным эффектом, что, по-видимому, именно в этой зоне способствует появлению дополнительных транспортных коммуникаций в виде цепочек фенестр.

Характерно, что в этой зоне растущего микрососуда мы не наблюдали активных фибробластов, а также развитого синтетического аппарата в эндотелиобластах. Эти факторы объяснимы с точки зрения тормозного эффекта гистамина на фибриллогенез (Gotlieb A.I. et al., 1983) и действия тучных клеток как регуляторов тканевого гомеостаза малого радиуса действия.

Заслуживает обсуждения и то, что гистамин активирует тромбоциты крови, а последние продуцируют гепарин. Эффект гепарина тромбоцитов усиливает деятельность гепарина, выделяемого тучными клетками, и их совместное действие приводит к значительному снижению вязкости крови и, соответственно, повышенной проницаемости растущего сосуда именно в этой зоне, что мы и наблюдали в нашем исследовании.

Наличие вокруг ростка в этой зоне значительной массы разрыхленного основного вещества, и по сути замены плотной соединительной ткани на рыхлую, за счет распада коллагеновых фибрилл и их лизиса макрофагами согласуется с данными исследований Folke L. (1970), который указывал, что тучные клетки также выделяют химазу, обладающую деполимеризирующим эффектом и стимулирующую фагоцитоз.

Таким образом, можно считать вполне доказанным, что трансформация эндотелия непрерывного типа лимба глаза в фенестрированный, повышение проницаемости микрососудов и замена плотной соединительной ткани на рыхлую связаны с действием химических веществ, выделяемых клетками крови, мигрировавшими в интерстиций, а именно: с тучными клетками, макрофагами, микрофагами, плазматическими клетками и клетками, заполнившими растущие сосуды – тромбоцитами и эритроцитами.

Несомненно, ведущая роль в активации микрососудистого окружения принадлежит изначально гистамину, выделяемому специфическими эндотелиальными тельцами Вейбеля-Паладе, численность которых, начиная с зоны переходного эндотелия возрастает, а в последующем усиливается химическими веществами, выделяемыми тучными клетками.

*Четвертая зона* – зона недифференцированного эндотелия. В этой зоне расположены утолщенные эндотелиальные клетки, у которых большую часть

занимает ядро, а периферическая часть и зона с органеллами почти отсутствуют. Эта зона находится на расстоянии 600–800 мкм от материнского сосуда и по протяженности составляет от 100 до 150 мкм. Стенка сосуда в этой зоне отграничена одной – двумя утолщенными, по сравнению с предыдущей зоной, эндотелиальными клетками. В цитоплазме эндотелиоцитов, на фоне снижения содержания всех органелл и особенно микровезикул, наблюдается значительное увеличение количества митохондрий. Фенестр нет, трансэндотелиальные каналы исчезают. По сути, эндотелий этой зоны напоминает эндотелий переходной зоны, различия между ними заключаются в резком снижении числа органелл специального назначения – микровезикул, а, следовательно, и значительном снижении транспортной активности эндотелия. Повышенное содержание митохондрий и расширенных цистерн эндоплазматической сети, по-видимому, характеризует активизацию синтетической активности эндотелия в этой зоне. Об этом свидетельствуют и мультивезикулярные тельца Вейбеля-Паладе, содержание которых в эндотелиоцитах продолжает оставаться высоким. Межклеточные контакты – плотные с наличием пятен и зон облитерации, в виде стыка, реже наложения.

Базальная мембрана находится в дезагрегатном состоянии, ее нет при обычном исследовании и только применение дополнительного контрастирования таниновой кислотой позволяет выявить фрагментированную базальную мембрану. Перicyты отсутствуют. Вокруг сосуда наблюдается распад соединительнотканых компонентов роговицы, коллагеновых фибрилл нет, только хлопьевидные массы собственного вещества.

В сравнении с предыдущей зоной, растущий капилляр в этой зоне практически полностью не проницаем для молекул белка, маркированных растительной пероксидазой.

Тем не менее, эндотелий в функциональном плане активен, неспокоен, так как в цитоплазме возрастает количество органелл синтетического аппарата клетки: расширенных цистерн гранулярной эндоплазматической сети и митохондрий.

В стенке растущих сосудов в этой зоне довольно постоянно мы наблюдали наполнение клеток друг на друга с формированием дополнительного просвета или встречали огромные вакуоли, вероятно, это – вновь формирующиеся новые микрососуды.

Микрососудистое окружение в этой зоне представлено фибробластами, макрофагами, плазматическими клетками. Тучные клетки, по-сравнению с предыдущей зоной, встречаются реже и располагаются на достаточном расстоянии от растущего сосуда. На этом фоне вокруг растущих сосудов возрастает частота обнаружения бластных клеток: фибробластов, эндотелиобластов, плазмобластов.

Не исключено, что происходит переход из одной бластной формы в другую, либо возможно наличие полипотентной клетки, которая может перейти из одной формы в другую. На такую возможность указывал еще Ранвье (1865). Наблюдаемые нами на ультраструктурном уровне изменения микрососудистого



окружения по зонам ростка показывают, что возможны скорее трансформации фибробластов в перициты и их совместное участие вместе с эндотелиоцитами в формировании базальной мембраны. Такое заключение согласуется с результатами исследований Kones R.(1980) и Гуриной О.Ю. с соавт. (1985), которые наблюдали митотическое деление фибробластов и их трансформацию в перициты при химической провокации ангиогенеза.

Начиная с этой зоны – зоны малодифференцированного эндотелия в просвете растущего сосуда появляются эритроциты, которые заполняют весь просвет, чем ближе к верхушке ростка, тем чаще обнаружение эритроцитов в просвете сосуда. Очевидно, это связано с тем, что растущие сосуды имеют разный характер формирования. Наряду с процессами миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, которые в конечном итоге дают остроконечные ростки, описанные еще Clark T.R. а.Clark E.L. (1939, 1940); возможен иной механизм развития ростков, описанный Illig I. (1961) и Cliff W.(1963) и сопровождающийся развитием мешотчатых структур. По нашему мнению, в начальных стадиях роста новых сосудов превалирует механизм пролиферации и миграции новых эндотелиоцитов. С момента установления перицитами контактов с эндотелиоцитами растущих микрососудов и включения контактного торможения движения, пролиферация замедляется, однако эндотелиоциты сохраняют подвижность своей мембраны и отдают цитоплазматические отростки, в которые заходят эритроциты. Такие данные были ранее получены в работах Гуриной О.Ю. с соавт. (1983) и Ausprunk D . (1977) с мечением тимидином эндотелиоцитов растущих сосудов. Они определили, что митотическая активность эндотелиоцитов на верхушке растущего сосуда минимальная, а возрастает по направлению к проксимальной части ростка.

Следовательно, изменения, наблюдаемые нами в изменении состава органелл эндотелиоцитов этой зоны, обуславливающие снижение основной функции эндотелиальных клеток – барьерно-транспортной, на фоне возрастания их синтетической свидетельствует об утрате эндотелием признаков дифференцированности и зрелости. Это напрямую согласуется с результатами исследований Palade G. (1961), который в качестве основного параметра дифференцированности и зрелости эндотелиоцитов указывал на содержание в них микропиноцитозных везикул.

*Пятая зона* – зона эндотелиобласта, находится в области верхушки ростка. Она расположена на расстоянии 850-950 мкм от материнского сосуда лимба, по протяженности самая коротка от 50 до 70 мкм.

Стенка сосуда в этой зоне значительно утолщена, просвет сосуда сформирован одной, реже двумя эндотелиальными клетками, в цитоплазме которых очень мало мелких микровезикул и слабо выражены все органеллы общего назначения. При этом в цитоплазме клеток возле ядер продолжают обнаруживаться специфические эндотелиальные тельца Вейбеля-Паладе, митохондрии и немногочисленные расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети.

Межклеточные контакты не всегда наблюдаются. При наличии контактов – они плотные в виде стыка или небольшого по протяженности наложения с наличием пятен, пята и зон облитерации контактирующих мембран. Довольно часто мы видели так называемый «бесшовный» эндотелий, то есть часто верхушка растущего капилляра образован всего одной клеткой, у которой даже нет никаких соединений. В просвете концевой отдела растущего сосуда, как правило, всегда находится эритроцит.

Очевидно из-за низкой пролиферативной активности эндотелиальных клеток в области верхушки ростка, происходит вытягивание отростка эндотелиоцита с накопленной цитоплазмой и в этот отросток протискивается эритроцит, который выступает в роли поршня, давящего на отросток и проталкивающего его в направлении стимуляторов роста (зоны ожогового поврежденья). Такое объяснение согласуется с гипотезой, предложенной Лесгафтом П.Ф. еще в 1922 году и подтверждено исследованиями Wolf J. Et al. (1972).

Базальная мембрана не видна, пероцитов нет.

В непосредственной близости от недифференцированного эндотелия часто наблюдается скопление клеток, по структуре напоминающих эндотелиобласты или фибробласты. Часто растущий сосуд в этой зоне окружен муфтой из малодифференцированных клеток – эндотелиобластов, являющихся отростками клеток, формирующих просвет нового сосуда. При этом создается впечатление, что эндотелиобласты, прежде чем отпочковаться несколько раз окутывают растущий сосуд, как бы его защищая. Особенно четко это прослеживается при изучении серийных ультратонких срезов, где видно, что клетки, принимаемые за пероцитоподобные или фибробласты оказываются связанными мостиками с эндотелиобластами, образующими стенку растущих сосудов. По-видимому, это можно объяснить «хрупкостью» растущих сосудов, о которой говорили Clark E.R. а. Clark E.L. (1939), Cliff W. (1963) и др. Наши данные свидетельствуют не о повышенном диapedезе клеток крови на протяжении всего ростка, что является признаком хрупкости растущего сосуда, по мнению указанных авторов, а о конкретной области растущего сосуда – переходной зоне, в которой наблюдается активный выход клеток крови в интерстиций. В области верхушки ростка выхода клеток крови в интерстиций мы не наблюдали и образование муфты из эндотелиобласта связано скорее с механизмом формирования самого ростка, а не со свойствами его стенки.

Мы не наблюдали транспорта веществ в этой зоне ростка, так как отсутствовали пути транспорта белка.

Возле верхушек растущих сосудов в непосредственной близости клеточное окружение достаточно скудно. Чаще всего наблюдается хлопьевидный материал лизированного собственного вещества роговицы. Иногда встречаются эритроциты, мигрировавшие из крови и частично окруженные цитолеммой эндотелиобласта.

Макрофаги, в цитоплазме которых находятся остаточные тельца с продуктами распада соединительнотканых компонентов роговицы мы

наблюдали крайне редко. В местах сохранных коллагеновых волокон постоянно наблюдаются отростки фиброцитов.

В области верхушки ростка часто наблюдаются бластные клетки и разрыхленное основное вещество соединительной ткани.

Таким образом, полученные нами данные дают возможность констатировать, что площадь ростка на всем его протяжении изменяется незначительно, при этом основные изменения связаны с изменением площади эндотелиальной выстилки и сопряженной с ней площадью просвета сосуда. Это было подтверждено морфометрическими исследованиями (Рис. 1).

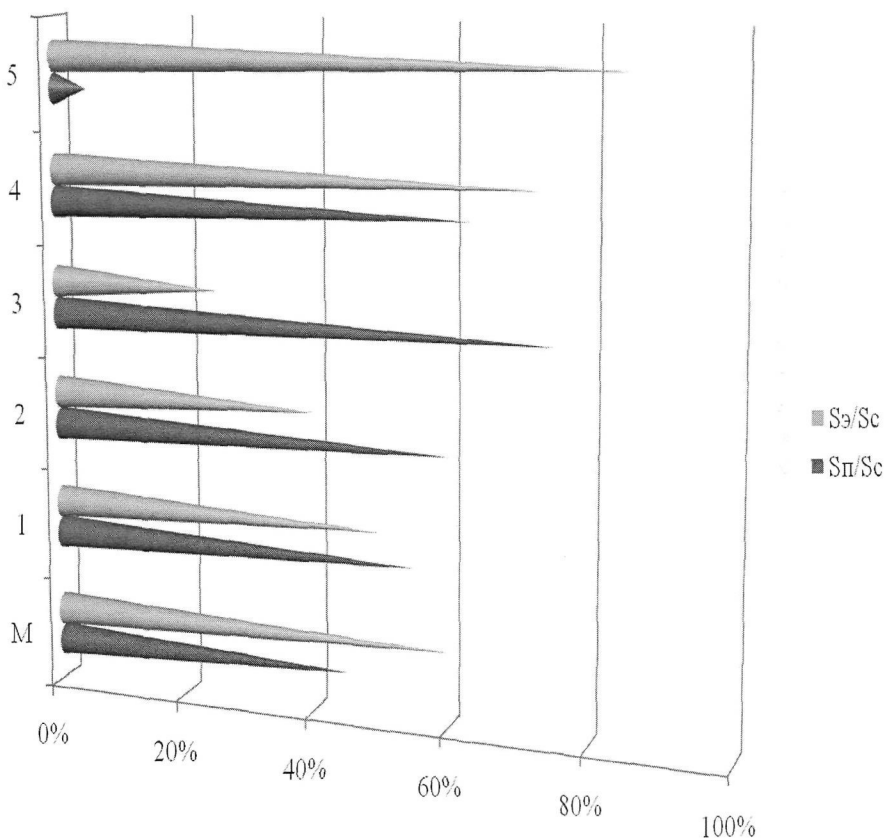


Рис. 1. Соотношение площади эндотелиоцитов и площади просвета сосуда к площади сосуда ( $S_{э}/S_c$ ;  $S_{п}/S_c$ ); М – материнский сосуд области лимба; 1-5 – зоны новообразованного кровеносного микрососуда;  $S_{э}$  – площадь эндотелиальной выстилки;  $S_{п}$  – площадь просвета сосуда;  $S_c$  – площадь сосуда.

На рисунке четко прослеживается, что на большем протяжении роста наблюдается увеличение просвета сосуда и его превалирование над эндотелиальной выстилкой, за исключением двух зон – верхушки роста и прилежащей к нему зоны недифференцированного эндотелия. При этом максимальные колебания касаются зоны максимального истончения эндотелия и развития транспортных коммуникаций, где просвет сосуда в несколько раз превалирует над эндотелиальной выстилкой, тогда как совершенно иная зависимость наблюдается в зоне недифференцированного эндотелия на верхушке роста и связана со значительным превалированием эндотелия над просветом сосуда. В 1 и 2 зонах новообразованного сосуда наблюдается незначительное превалирование площади просвета сосуда над площадью эндотелия, тогда как в четвертой зоне некоторое превалирование эндотелия над просветом сосуда связано с наличием многочисленных выростов эндотелиальных клеток, как с базальной, так и люменальной поверхности, и при этом повторяет подобную закономерность в материнском сосуде области лимба. У материнского сосуда эта закономерность объясняется наличием сосудов с эндотелием непрерывного типа.

В отношении сосудистого микроокружения можно заключить, что оно оказывает несомненное влияние на растущий сосуд. При этом наблюдаемый клеточный полиморфизм в зависимости от зоны растущего капилляра дает возможность сделать заключения и выводы о наличии корреляции между растущими сосудами и сосудистым микроокружением, определяющим не только темпы роста микрососудов, но и их барьерно-транспортные свойства и степень дифференцированности эндотелиальных клеток на протяжении растущего микрососуда.

## **ВЫВОДЫ**

1. В растущем микрососуде на 9 сутки роста выделено 5 различных зон:
  - зона относительно дифференцированного эндотелия;
  - зона переходного эндотелия от непрерывного к фенестрированному типу;
  - зона фенестрированного эндотелия (максимального развития транспортных коммуникаций);
  - зона недифференцированного эндотелия;
  - зона эндотелиобласта (верхушки роста).
2. Клеточный состав вокруг растущих микрососудов отличается полиморфизмом, в зависимости от зоны растущего капилляра. Наиболее выражен клеточный полиморфизм в зоне фенестрированного эндотелия (максимального развития транспортных коммуникаций).
3. Барьерно-транспортные свойства эндотелиальной выстилки различных зон растущего микрососуда зависят от клеточного микроокружения и характеризуются отличием в строении транспортных каналов на протяжении роста.

4. При асептическом воспалении в окружающие микрососуды ткани мигрируют клеточные элементы крови, которые изменяют структуру плотной соединительной ткани роговицы и ее матрикс, тем самым создавая условия для роста новых сосудов.
5. Изменения плотной соединительной ткани роговицы и ее трансформация в рыхлую соединительную ткань является обязательным условием роста и формирования новых сосудов. При этом одновременно идут два сопряженных процесса: лизис существующей ткани роговицы глаза и развитие на ее месте другой.
6. Степень дифференцированности и зрелости эндотелиоцитов, формирующих стенку растущего капилляра, зависит от микрососудистого окружения. Зрелость эндотелиальных клеток обусловлена формированием контактов с перицитами, а степень дифференцированности эндотелиоцитов определяется барьерно-транспортными свойствами растущего капилляра.

### **Практические рекомендации**

1. Результаты исследования могут быть использованы в педагогическом процессе в курсе гистологии для студентов медицинских ВУЗов и при последипломном обучении морфологов и гистологов.
2. Полученные нами новые сведения о темпе и характере роста сосудов роговицы глаза должны учитываться при лечении ожоговых повреждений глаза.
3. Детальное ультраструктурное изучение роста микрососудов и клеточного окружения при вторичном ангиогенезе может быть экстраполировано на процессы регенерации микрососудов при различных нарушениях тканевого гомеостаза (воспалении, гипоксии, некрозе и регенерации).

### **Список научных работ**

1. Гурина О.Ю., Никишин Р.А., Гурин Я.В. Электронномикроскопическое изучение сосудов микроциркуляторного русла глаза крыс при электростимуляции // Материалы всероссийской научной конференции «Гистологическая наука России в начале 21 века: итоги, задачи, перспективы». – 22-24 октября 2003 г. – М. – Издательство РУДН. – С.98-99.
2. Гурин Я.В., Борулава О.А., Рукин Е.М., Гурина О.Ю. Изучение микроциркуляторного русла кожи в рефлексогенных зонах при действии световых волн // Материалы III Конгресса с международным участием «Российский медицинский форум и V международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность». – 20-21 ноября 2008 г. – М. – С.41-42.
3. Гурина О.Ю., Гурин Я.В., Павлович Е.Р., Федосеев В.А., Писцова Т.В. К вопросу о морфологии эндотелиальной выстилки сосудистой системы человека, как результата эволюции сосудистой системы // Сборник

- научных трудов «Проблемы и перспективы современной науки». – Томск 2008 г.. – Вып. 1. – С.31.
4. Гурина О.Ю., Борулава О.А., Гурин Я.В. Изучение клеточного микроокружения растущих сосудов роговицы глаза кролика // Ж. Морфология. – 2009 г. – №4. – С.45.
  5. Гурина О.Ю., Гурин Я.В., Борулава О.А., Павлович Е.Р. К вопросу изучения регуляции процессов ангиогенеза путем воздействия на клеточные элементы, окружающие растущие сосуды // Сборник научных трудов на международном форуме «Интегративная медицина – 2009». – 5-7 июня 2009 г. – М. – Вып.4. – С.30-31.
  6. Гурин Я.В. Морфологический анализ новообразованных сосудов и клеточного микроокружения // Ж. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009 г. – Том 147. – №11. – С.593-596
  7. Гурин Я.В., Павлович Е.Р., Гурина О.Ю. Морфо-функциональная характеристика клеток соединительной ткани при новообразовании сосудов в эксперименте // Материалы конференции, посвященной 85-летию со дня рождения профессора П.Ф.Степанова. – Смоленск. – 2009 г.– С.28-29.

---

Заказ № 121-а/08/09 Подписано в печать 22.10.2009 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1.5

---



ООО "Цифровичок", тел. (495) 649-83-30; (495) 778-22-20  
[www.cfr.ru](http://www.cfr.ru) ; *e-mail*: [info@cfr.ru](mailto:info@cfr.ru)