

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ МАГИСТРАЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНЫХ СОСУДОВ В ОТДАЛЕННОМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

И. В. Мухина, Р. С. Куликов, Е. И. Яковлева, Н. Н. Андреева,
Н. Н. Проданец, Л. Б. Снопина, М. Л. Бугрова

Центральная научно-исследовательская лаборатория
ГОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Росздрава, Нижний Новгород

Structural and Functional Rearrangement of Great Arterial Vessels in the Late Postresuscitative Period

I. V. Mukhina, R. S. Kulikov, Ye. I. Yakovleva, N. N. Andreyeva,
N. N. Prodanets, L. B. Snopova, M. L. Bugrova

Central Research Laboratory, Nizhni Novgorod State Medical Academy,
Russian Committee of Health Care, Nizhni Novgorod

Цель исследования изучить особенности ремоделирования аорты, сонной и бедренной артерий в отдаленном постреанимационном периоде. **Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах при моделировании клинической смерти по Корпачеву В. Г. в результате 10-минутного пережатия сердечно-сосудистого пучка. До клинической смерти и через 60 суток после реанимации регистрировали артериальное давление, содержание малонового диальдегида в ткани сосудов, показатели биоchemиллюминесценции в плазме крови, проводили микроскопические и ультрамикроскопические исследования ткани магистральных сосудов. **Результаты.** Показано, что на 60-е сутки после реанимации формируется единый соединительнотканый каркас в интиме и меди магистральных сосудов путем хаотичного синтеза разнонаправленных волокон. На световом уровне это выявлялось в виде увеличения содержания коллагеновых волокон во внутреннем и среднем сосудистых слоях. В меди аорты, сонной и бедренной артерий происходило увеличение количества секретирующих гладкомышечных клеток и содержания коллагеновых волокон, что представляло собой процесс активного ремоделирования сосудистой стенки. Одним из факторов, запускающих процессы ремоделирования после ишемии, явилось усиление свободнорадикальных процессов при реперфузии как в целом организме, так и в ткани сосудистой стенки. Нарушение процессов регуляции сосудистого тонуса, обусловленное развитием ремоделированием сосудистой стенки по типу разрастания соединительной ткани, способствовало развитию гипертензивной реакции в отдаленном периоде. **Заключение.** В отдаленном постреанимационном периоде наблюдалось увеличение количества соединительной ткани в меди магистральных сосудов, неполноценное восстановление морфо-функционального состояния эндотелиальной выстилки, что, вероятно, явилось одной из причин увеличения «жесткости» сосудов и повышения артериального давления у крыс через 2 месяца после реанимации. **Ключевые слова:** магистральные сосуды, постреанимационный период, ультраструктура, ремоделирование, перекисное окисление липидов, гипертензия.

Objective: to study the specific features of remodeling of the aorta, carotid, and femoral artery in the late postresuscitative period. **Materials and methods.** Experiments were carried out on non-inbred albino rats when clinical death was stimulated by the method of V. G. Korpachev due to 10-minute cardiovascular fascicle ligation. Before clinical death and 60 days after resuscitation, blood pressure, vascular tissue malonic dialdehyde levels, and plasma biochemiluminescence parameters were recorded and great vascular tissue microscopic and ultramicroscopic studies were conducted. **Results.** On day 60 following resuscitation, a unitary connective tissue carcass was shown to form in the great vascular intima and media via chaotic synthesis of heretodirectional fibers. This appeared as elevated levels of collagenous fibers in the intima and media as shown by light microscopy. The aortic, carotid, and femoral arterial media displayed a large number of secreting smooth muscle cells and elevated levels of collagenous fibers, which was an active vascular wall remodeling process. Enhanced free radical processes during reperfusion both in the whole organism and vascular wall tissue were one of the triggers of remodeling processes after ischemia. Impaired vascular tone regulation caused by the development of vascular wall remodeling by the connective tissue vegetation growth type contributed to the development of a hypertensive response in the late period. **Conclusion.** The late postresuscitative period was marked by increased connective tissue in the media of great vessels, by imperfect recovery of the morphofunctional status of the endothelial lining, which was likely to be a cause of increased vascular stiffness and elevated blood pressure in rats 2 months after resuscitation. **Key words:** great vessels, postresuscitative period, ultrastructure, remodeling, lipid peroxidation, hypertension.

Одним из факторов, способствующих развитию тяжелых проявлений постреанимационной болезни, является реперфузионное повреждение. Воздействие ишемического и реперфузионного фактора на ткани реализуется через кровеносное русло и непосредственно через сосудистую стенку на уровне обменных капилляров [1]. Совместная с сердцем функция адекватного кровоснабжения тканей магистральными артериями обеспечивается при условии структурного гомеостаза эндотелия и всех слоев сосудистой стенки. Повреждение сосудистой стенки при ишемии и последующей реперфузии ведет к нарушению баланса регуляторных систем, запуску этапов ремоделирования. Современные методы диагностики изменения стенки крупных артерий — ультразвук, функциональные пробы — позволяют зафиксировать наиболее общие проявления ремоделирования — утолщение интимо-медиального комплекса [2], утрату вазодилатирующих свойств сосуда [3, 4]. Необходимость комплексного электронно-микроскопического и функционального исследования процессов ремоделирования магистральных артерий в целях разработки комплекса мероприятий по диагностике, профилактике и коррекции постреперфузионных осложнений является приоритетной в реаниматологии, кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии. К настоящему времени достаточно проанализирована роль свободно-радикальных процессов в формировании эндотелиальной дисфункции [5, 6]. Однако обобщающих исследований с целью изучения патогенетической роли тотальной ишемии и реперфузии в формировании отсроченных осложнений в виде ремоделирования стенки сосудов и изменения эластических свойств на основании параллельного изучения биохимических и электронно-микроскопических показателей до настоящего момента не проводилось.

В связи с этим, цель исследования — изучить особенности структурной перестройки аорты, сонной и бедренной артерий в отдаленном постреанимационном периоде и зависимости между морфологической трансформацией и функциональными параметрами данных сосудов в эксперименте.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 220 белых нелинейных крысах-самцах массой 200–250 г, находящихся на стандартном рационе вивария. Для исследования морфофункционального изменения магистральных артериальных сосудов после тотальной ишемии проведены эксперименты с моделированием клиничес-

кой смерти путем 10-и минутного пережатия сердечно-сосудистого пучка по Корпачеву В. Г. [7] с последующей реанимацией. На 60-е сутки после реанимации измеряли артериальное давление, изолировали ткани артериальных сосудов для биохимических и морфологических исследований, определяли интенсивность свободно-радикального окисления в плазме крови. Для гистологических исследований образцы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме Leica SM 2000R и окрашивали гематоксилин-эозином по Ван-Гизону для выявления коллагеновых волокон и фукселином по Вейгерту для выявления эластических волокон. Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Leica DMLS. Для электронно-микроскопического исследования после фиксации в глотаровом альдегиде и осмиевой кислоте материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в эпоксидные смолы ЭПОН-812 — АРАЛДИТ. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме ULTRACUT (Reicher-yung), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по методу Reynolds и просматривали в электронном микроскопе Morgagni 268D фирмы FEI. Вычисление количества и площадей внутриклеточных структур проводили автоматизировано при помощи графических программ, либо наложением на изображение при стандартном увеличении сетки со стандартным размером ячеек и подсчетом совпавших полей с последующим их суммированием. Площадь выражали в условных единицах по Wassilew V. J., (1982).

Измерение показателей хемилюминесценции плазмы производили на биохемилюминометре БХЛ-06 (г. Нижний Новгород). Об активности процесса перекисного окисления липидов в ткани сосудов судили по накоплению вторичных молекулярных продуктов перекисаации — малонового диальдегида (МДА).

Измерение артериального давления у крыс проводили инвазивным методом, катетеризируя каротидную артерию. Запись артериального давления осуществляли с помощью датчика давления фирмы «Motorola» MPX 5050DP. Полученный сигнал обрабатывали с помощью программного комплекса «PowerGraph» V.2.0., совместимого с IBM-PC.

Статистическую обработку полученных данных проводили на ПК с помощью пакетов прикладных программ Statistica 5.5 для Windows 98. Парные внутригрупповые и межгрупповые сравнения средних определяли по критериям Уилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе изучения ультраструктуры интимы артерий в отдаленном постреперфузионном периоде не были обнаружены острые проявления повреждения. Эндотелиальный пласт восстановлен практически полностью (рис. 1), но репарация отдельных клеток после

Таблица 1

Количественные параметры изменения клеточных структур (усл. единицы) в гладкомышечных клетках магистральных артерий в отдаленном постреанимационном периоде ($M \pm m$)

Показатель	Значения показателей					
	Аорта		Сонная артерия		Бедренная артерия	
	Инт	оПР	Инт	оПР	Инт	оПР
Количество рибосом	904±22,5	1088±18,7*	1123±20,2	1262±21,3*	896±16,6	990±18,2*
Площадь мембран ЭПС	176±6,8	198±7,7*	143±6,5	165±5,1*	158±5,8	185±9,2*
Количество волокон	65±2,9	78±1,4*	53±2,3	65±1,8*	51±1,6	61±1,3*
Площадь наружных мембран митохондрий	93±3,1	91±2,9	78±3,0	65±3,3	85±2,1	74±2,9
Площадь крист митохондрий	225±5,4	215±5,1	198±3,8	189±3,6	188±4,2	192±5,1

Примечание. * — различие с интактными животными, $p < 0,05$. Инт — интактные животные; оПР — отдаленный постреанимационный период.



Рис. 1. Ультраструктура эндотелия каротидной артерии: значительное увеличение объёма матрикса подэндотелиального слоя. В основном веществе матрикса выявлены коллагеновые волокна. Эндотелий плотный с большим количеством пиноцитозных везикул, отдельными небольшими вакуолями. В цитоплазме много рибосом и полисом. Ув. 11 000.

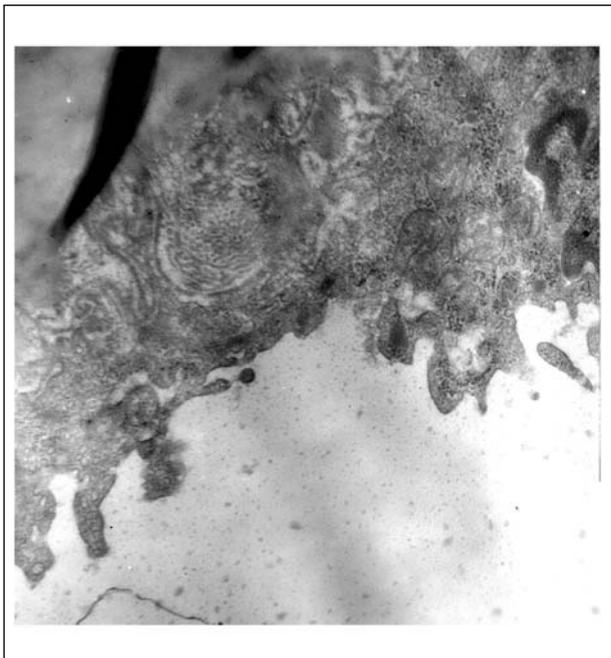


Рис. 2. Ультраструктура эндотелия аорты: люминальная мембрана эндотелиоцитов аорты образует микровыросты, клазматоз, цитоплазма с большим количеством пиноцитозных пузырьков. Ув. 26 000.

ишемического/реперфузионного повреждения происходила с разной скоростью на различных участках в соответствии с мозаичностью строения стенки артерий. На внутренней поверхности эндотелиоцитов присутствовали микроворсины и микровыросты (рис. 2). Подавляющее количество эндотелиоцитов характеризовались восстановлением микропиноцитозного транспорта на люминальной и базальной сторонах, в расширенном подэндотелиальном слое встречались коллагеновые волокна (рис. 1). Межклеточные контакты эндотелия были плотными, местами умеренно расширенными. В некоторых участках аорты, сонной и особенно бедренной артерии наблюдали дезориентированные к кровотоку клетки, что, видимо, объясняется активным закрытием деэндотелизированных участков после однократной или повторной десквамации регенерирующих клеток. Единичные деэндотелизированные участки, по площади гораздо меньшие, чем таковые в раннем постреанимационном периоде, покрыты тромбоцитами, что объясняется повторной деэндотелизацией неполноценных эндотелиальных клеток в процессе закрытия массивных участков. Клетки с несинхронным восстановлением структуры присутствовали чаще в бедренной артерии.

Митохондрии большинства эндотелиальных клеток мало отличались по площади и структуре от митохондрий интактных клеток, кристы и матрикс имели обычный вид. В большинстве клеток были активны синтетические процессы и секреторная функция, что подтверждалось наличием у плазматической мембраны элементов экзоцитоза с электронно-плотным содержимым, несколько увеличенным количеством рибосом и полисом (рис. 2), умеренно расширенным эндоплазматическим ретикуломом. Данные факты свидетельствовали об активном синтезе в эндотелиальном пласте на 60-е сутки.

При изучении средней оболочки сосудов в отдаленном реперфузионном периоде на 60-е сутки также не было зафиксировано острых адаптивных проявлений. Основные клеточные элементы, идентифицируемые в меди в данном периоде — гладкомышечные клетки отростчатые, синтетического типа, сократительного типа и переходные клетки — миофибробласты (рис. 3–6). Отростчатые и переходные клетки встречались чаще, чем в интактных сосудах, что позволяет предположить процесс трансформации сократительных клеток в секреторные на 60-е сутки. Распространение их отростков, а иногда и миграция этих клеток в сторону эндотелиоцитов шли через места разрывов фрагментированной внутренней эластической мембраны. Клетки переходного типа также характеризовались активным процессом синтеза (рис. 4).

Структура цитоплазмы клеток меди в отдаленном постреанимационном периоде была плотной, без признаков гидратации. Цитоплазматические пузырьки располагались в клетках сократительного типа более концентрировано по внутренней поверхности цитоплазматической мембраны и меньше в цитоплазме. В синтетических гладкомышечных клетках пузырьки располагались в цитоплазме диффузно. Количество миофиламентов было

Показатели биофлуоресценции плазмы крови и содержание МДА в ткани артериальных сосудов интактных крыс в раннем и отдаленном постреанимационном периоде ($M \pm m$)

Серия эксперимента	I _{max} , mV	S, mV	МДА, нмоль/г ткани
Интактные	1,972±0,105	18,688±1,68	1,656±0,212
60 мин после реанимации	3,637±0,110*	41,207±1,25*	7,636±0,135*
60 суток после реанимации	3,20±0,134	39,75±1,25*	5,476±0,341*

Примечание. * — достоверность различий с интактным уровнем, $p < 0,05$.

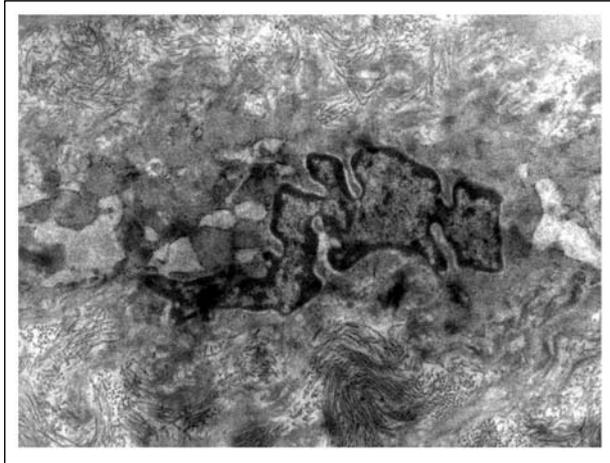


Рис. 3. Ультраструктура средней оболочки сонной артерии: расширенный гранулярный эндоплазматический ретикулум, содержащий преколлаген, множество соединительнотканых волокон вокруг, фрагментированное ядро с маргинальным расположением хроматина. Ув. 8 000.

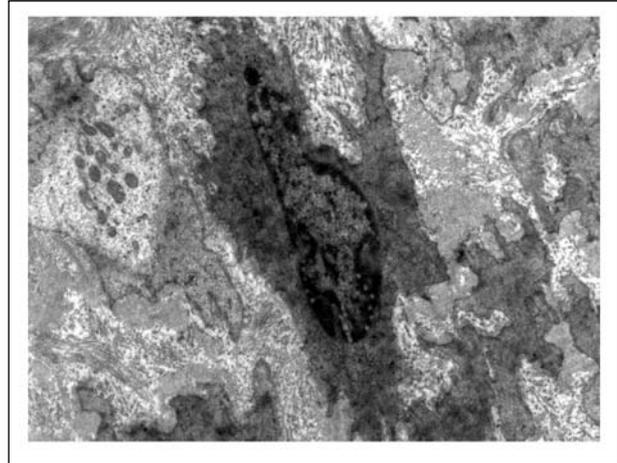


Рис. 4. Ультраструктура средней оболочки сонной артерии: активные фибробласты. Ув. 8 000.

максимально в сократительных веретенообразных клетках и минимально в отростчатых. Дегенеративные темные формы клеток встречались крайне редко. Миелоидные фигуры распределялись равномерно в толще меди, что говорило о протекании процессов перекисного окисления в постреанимационном периоде на более высоком уровне, чем у интактных животных.

В общей картине меди наблюдалось увеличение числа белок-синтетических единиц. В расширенной и увеличенной гладкой и шероховатой эндоплазматической сети определялись фрагменты синтезируемых волокон (рис. 3). Точная дифференциация коллагеновых и эластических волокон часто была затруднена, но с учетом оптической толщины волокон предположительно более активно синтезировались коллагеновые волокна, концентрирующиеся после выхода из клеток вокруг гладких миоцитов. Разницы в интенсивности синтеза волокон в аорте, сонной и бедренной артериях не выявлено. Очень активный синтез волокон местами обнаруживался в переходных клетках. Ядерный аппарат был более активен в синтетических клетках и содержал четкие ядрышки, уплотненную кариоплазму, увеличенный маргинальный хроматин. Ядерные поры открыты, перинуклеарное пространство умеренно расширено. В сократительных клетках ядра характеризовались округлой продолговатой формой с плотной кариоплазмой.

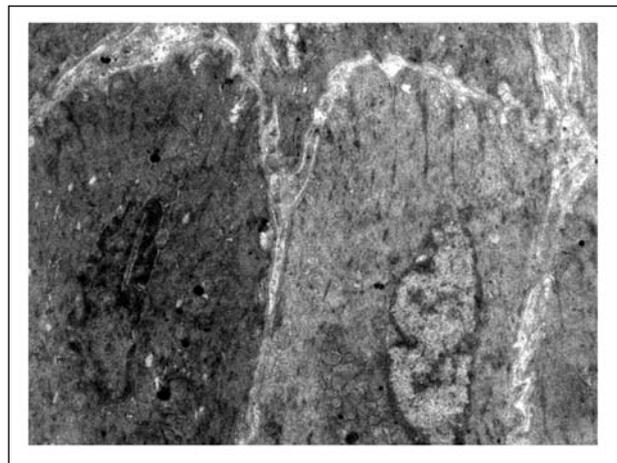


Рис. 5. Ультраструктура средней оболочки бедренной артерии: темный и светлый миоциты, гиперплазия митохондрий. Ув. 8000.

Структура митохондрий гладкомышечных клеток и общая площадь, занимаемая митохондриями в клетке, не отличались от интактных значений (табл. 1).

Ведущим признаком сосудистого ремоделирования в меди в отдаленном постреанимационном периоде было образование в повышенном количестве фрагментов соединительной ткани — коллагеновых и эластических волокон в толще оболочки. Отмечалось утолщение и неравномерность эластических мембран, имеющих нечеткие границы. Межклеточное вещество артерий было представлено хаотичными коллагено-

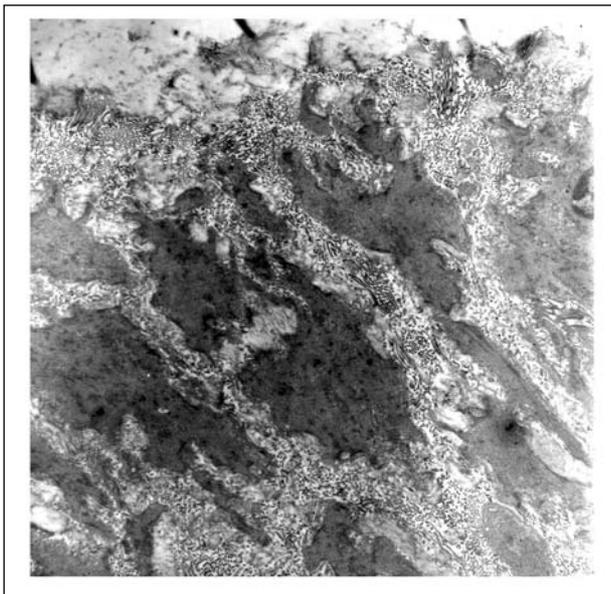


Рис. 6. Ультраструктура средней оболочки аорты: миоциты, увеличенный объём матрикса с преобладанием волокон, хаотично направленных относительно друг друга. Ув. 11000.

выми и эластическими волокнами, по количеству превосходящими основное вещество. В толще медики волокна распределялись практически равномерно, с некоторым превалированием волокнистых структур во внутренних слоях. За счет большого количества соединительной ткани миоциты казались разрозненными (рис. 6).

Таким образом, в отдаленном постреанимационном периоде отмечена активная пролиферация и восстановление эндотелиального пласта. Результаты исследований структуры клеток медики позволяют предположить трансформацию сократительных клеток в секреторные в сжатые сроки после ишемического/реперфузионного повреждения с последующей активной выработкой этими клетками компонентов соединительной ткани, что представляет основу ремоделирования крупных сосудов в постреанимационном периоде.

Изучение биохимических параметров плазмы крови по данным биохемилюминесценции в отдаленном постреанимационном периоде выявило снижение свободнорадикальной активности относительно уровня 60 мин постреанимационного периода. Однако этот показатель оставался выше уровня у интактных крыс на фоне сниженной общей антиоксидантной активности плазмы. Содержание вторичного продукта перекисного окисления липидов МДА в ткани артериальных сосудов снижалось относительно раннего периода, но оставалось все же более высоким, чем у интактных животных в 1,5 раза. Таким образом, на 60-е сутки постреанимационного периода сохранялся повышенный уровень свободнорадикального окисления при сниженной активности антиоксидантных систем плазмы крови (табл. 2).

В отдаленном постреанимационном периоде на 60-е сутки отмечался рост артериального давления на

23,3% ($133,6 \pm 3,2$ мм рт. ст., $p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем до моделирования клинической смерти ($108,3 \pm 2,2$ мм рт. ст.).

Изучение морфологии магистральных сосудов в отдаленном постреанимационном периоде на 60-е сутки продемонстрировало формирование единого соединительнотканного каркаса в интима и медики путем хаотичного синтеза разнонаправленных волокон. На тканевом уровне это выявлялось в виде увеличения содержания коллагеновых волокон во внутреннем и среднем слоях артериальных сосудов. На ультраструктурном уровне в интима магистральных сосудов отсутствовали признаки острого повреждения, подавляющее большинство эндотелиальных клеток характеризовались восстановлением ультраструктуры, микропиноцитозного транспорта на люминальной и базальной сторонах. В большинстве клеток были активны синтетические процессы и секреторная функция. Следует заметить, что развития неоинтимы, широко описанного в литературе при действии механического фактора [8, 9] в виде миграции в интиму активных миофибробластов, их деления и синтеза матрикса, утолщения эндотелиального слоя, пролиферации и неправильной ориентации гладкомышечных клеток в интима, нами не было отмечено. Вероятно, выявленное отличие заключается в разнице этиологических факторов, вызывающих ремоделирование стенки сосудов в различных условиях. При хронической гипертензии гиперразвитие неоинтимы, в основном, обусловлено длительным воздействием повышенного напряжения сдвига (shear stress) на внутреннюю эластическую мембрану и частично гладкомышечные клетки внутренних слоев медики [10–12], запускающих каскад внутриклеточных метаболических реакций [13], приводящих к формированию утолщения интимы. Отсутствие фактора длительного механического воздействия на стенку сосуда, а лишь наличие кратковременного воздействия в момент реперфузии, в наших экспериментах обусловило несколько иное направление ремоделирования [14]. Ремоделирование в интима после кратковременного острого ишемического/реперфузионного повреждения развивалось исключительно по типу закрытия дефекта и повышения синтетической функции, направленной на увеличение количества соединительнотканых элементов.

При изучении средней оболочки сосудов в отдаленном постреперфузионном периоде на 60-е сутки также было зафиксировано появление в большем количестве отростчатых гладкомышечных клеток синтетического типа и клеток переходного типа — миофибробластов, что обусловило образование в повышенном количестве коллагеновых и эластических волокон в толще оболочки [15].

Одним из факторов, инициирующих пролиферативные процессы в эксперименте, явилось сохранение высокой активности свободнорадикальных процессов, как в организме, так и в ткани магистральных сосудов спустя 2 месяца после реанимации. Сохранение дисба-

ланса в проантиоксидантной системе в сосудистой стенке ведет к возрастанию риска развития сосудистых осложнений в отдаленном постреанимационном периоде (например, атеросклероза), так как чрезмерная активация свободнорадикальных реакций в клетках приводит к дальнейшему нарушению гомеостаза по типу положительной обратной связи [16]. Кроме того, ремоделирование по типу фиброза сосуда с увеличением относительной массы коллагена в сосудистой стенке и изменение межклеточных взаимодействий эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, нарушает регуляторные механизмы расслабления сосудистой стенки [17], что, в свою очередь, может быть причиной развития постреанимационной гипертензии.

Литература

1. *Биленко М. В.* Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М: Медицина; 1989.
2. *Escobar E. et al.* Relation of intimal hyperplasia thickness to stent size in rapitaxel-coated stents. *Am. J. Cardiol.* 2004; 94 (2): 196–198.
3. *Беленков Ю. Н., Мареев В. Ю., Азеев Ф. Т.* Эндотелиальная дисфункция при сердечной недостаточности: возможности терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента. *Кардиология* 2001; 5: 100–104.
4. *Kervancioglu S., Davutoglu V., Ozkur A. et al.* Carotid and brachial intima-media thickness, arterial diameter and resistivity indices in aortic regurgitation. *Acta Radiol.* 2004; 45 (8): 815–818.
5. *Beetsch J. W., Park T. S., Dugan L. L. et al.* Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 1998; 786 (1–2): 89–95.
6. *Laude K., Richard V., Thuillez C.* Coronary endothelial cells: a target of ischemia reperfusion and its treatment? *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 2004; 97(3): 250–254.
7. *Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З.* Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиология и эксперим. терапия* 1982; 3: 78–80.
8. *Hodis H. N., Mark W. J., Za Bree Z. et al.* The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann. Intern. Med.* 1998; 128: 262–269.
9. *Bots M. L., Grobbee D. E., Hofman A., Witteman J. C.* Common carotid intima-media thickness and risk of acute myocardial infarction: the role of lumen diameter. *Stroke* 2005; 36 (4): 762–767.
10. *Traub O., Berk B.* Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18 (5): 677–685.
11. *Givrand X. et al.* Remodeling of the radial artery in response to a chronic increase in shear stress. *Hypertension* 1996; 27: 799–803.
12. *Шляхто Е. В., Мусеева О. М.* Клеточные аспекты ремоделирования сосудов при артериальной гипертензии. *Артериальная гипертензия* 2002; 8 (2): 45–48.
13. *Taddei S. et al.* The role of endothelium in human hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertension* 1998; 7 (2): 203–209.
14. *Sutcliffe M. S., Davidson J. M.* Increased tropoelastin production by porcine aorta smooth muscle cells stretched during in vitro culture. *Collagen Relat. Res.* 1998; 8: 538.
15. *Caleb B. L. et al.* Isolation of vascular smooth muscle cell cultures with altered responsiveness to the antiproliferative effect of heparin. *J. Cell. Physiol.* 1996; 167 (2): 185–195.
16. *Inauen W. et al.* Hypoxia/reoxygenation increases the permeability of endothelial cell monolayers: role of oxygen radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 1990; 9 (3): 219–223.
17. *Risler N. R., Cruzado M. C., Miatello R. M.* Vascular remodeling in experimental hypertension. *Sci. World J.* 2005; 12 (5): 959–971.

Поступила 02.05.06