

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЭНДОТЕЛИЯ МИКРОСОСУДОВ МИОКАРДА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ИСКУССТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

© Г. М. Казанская

ФГУ «Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е. Н. Мешалкина Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», Новосибирск

Проведен сравнительный анализ ультраструктуры эндотелия микрососудов (МС) миокарда при воздействии различных методов искусственной гипотермии. Биоптаты правого предсердия получали у детей, страдающих врожденным дефектом межжелудочковой перегородки (ДМЖП), после общего охлаждения организма в условиях гипотермического искусственного кровообращения (ИК) и бесперфузионной (иммерсионной) гипотермии (БПГ). Показано, что сдвиги популяционного состава эндотелиальных клеток (ЭК), а также изменения ультраструктуры органелл, принимающих участие во внутриклеточных синтезах и трансэндотелиальном переносе макромолекул, зависят от скорости общего охлаждения организма. В условиях БПГ и сравнительно медленного темпа охлаждения морфологические признаки торможения метаболизма ЭК выявляются параллельно количественной редукции показателей их микропиноцитозного транспорта. При гипотермическом ИК эти реакции запаздывают из-за высокой скорости охлаждения, индуцирующей гетерогенный ответ различных внутриклеточных процессов на изменение температуры тела.

Ключевые слова: эндотелий, микрососуды, миокард, микропиноцитоз, ультраструктура, искусственная гипотермия.

Принятые сокращения: АГ — аппарат Гольджи, БПГ — бесперфузионная гипотермия, ГЭР — гранулярный эндоплазматический ретикулум, ДМЖП — дефект межжелудочковой перегородки, ИК — искусственное кровообращение, МПВ — микропиноцитозные везикулы, МС — микрососуды, ЭК — эндотелиальные клетки.

Изучение патофизиологии сердечно-сосудистой системы в условиях искусственного охлаждения организма до недавнего времени проводилось с акцентом на сократительную деятельность мышцы сердца (Sun et al., 1997; Ning et al., 1998). Механизмы влияния гипотермии на тонкую структуру микрососудов (МС) миокарда исследованы значительно меньше. Вместе с тем установлено, что сосудистый эндотелий принимает участие в обеспечении наиболее значимых общебиологических процессов в системе микроциркуляции ткани. При этом процессы вазодилатации—вазоконстрикции, коагуляции—антикоагуляции крови, регуляции иммунных и ферментативных реакций, происходящих во внутрисосудистом пространстве, а также контроль состояния трансэндотелиального обмена в микрорайоне ткани являются чувствительными к воздействию низких температур (Ignarro, 1989; Barkalow et al., 1996; Kayashima et al., 1998).

В настоящее время большинство операций на открытом сердце осуществляется в условиях общего охлаждения организма, которое достигается с помощью гипотермического искусственного кровообращения (ИК) или бесперфузионной гипотермии (БПГ) (Литасова и др., 1988; Бураковский, Бокерия, 1989). Согласно данным клинических и экспериментальных исследований, оба метода сопровождаются изменениями ультраструктуры органелл эндотелиальных клеток (ЭК), принимающих участие во внутриклеточных синтезах, и температуроза-

висимыми реакциями структур, осуществляющих трансэндотелиальный перенос макромолекул (Шереметьева, Иванова, 1997; Kazanskaya et al., 1999). Параллельно подтверждено, что информативность и значимость подобных исследований возрастают в случае сочетания методов описательной электронной микроскопии, учитывающей разнообразие морфологических разновидностей клеток в составе эндотелия МС, и ультраструктурной морфометрии. Тем не менее сравнительный анализ ультраструктуры эндотелия и механизмов регуляции микропиноцитоза, включающихся в системе МС на клеточном и субклеточном уровнях при различных методах искусственной гипотермии, не проводился.

Цель настоящего исследования состояла в оценке особенностей ультраструктурной перестройки эндотелия сосудов терминального отдела микроциркуляторного русла миокарда при общем охлаждении организма в условиях гипотермического ИК и БПГ.

Материал и методика

Ультраструктурный анализ эндотелия МС миокарда проводили у 16 пациентов в возрасте от 1 года до 4 лет, оперированных по поводу врожденного дефекта межжелудочковой перегородки (ДМЖП). Анестезиологическое обеспечение оперативной коррекции порока осуществ-

ляли с помощью двух методов общего охлаждения организма — гипотермического ИК и БПГ. Клиническое применение обоих методов основывается на способности гипотермии увеличивать толерантность всех органов и тканей к гипоксии, возникающей в ходе кардиохирургических вмешательств как следствие вынужденной остановки сердечной деятельности на длительный срок. Для обеспечения гипотермии бесперфузионным способом производят наружное охлаждение организма с помощью мелко наколотого льда, которым обкладывают поверхность тела пациента. Принципиальным отличием метода гипотермического ИК является использование аппарата искусственного кровообращения, который подключают к магистральным сосудам сердца (аорте и полым венам) и заполняют перфузатом сложного состава, включающим в себя цельную кровь, раствор Рингера—Локка, маннитол, гепарин и др. При этом способе гипотермия достигается циркуляцией перфузата с постепенным снижением его температуры по кровеносному руслу организма.

Материалом для электронно-микроскопического анализа служили диагностические биоптаты правого предсердия. У пациентов, которым коррекцию порока выполняли под защитой гипотермического ИК, биоптаты получали до канюляции полых вен при нормальной температуре в пищеводе (группа 1, $T_n = 36\text{—}37^\circ\text{C}$, $n = 6$) и в конце перфузионного охлаждения организма до 25°C (группа 2, $n = 5$). У пациентов, оперированных в условиях БПГ, набор биопсийного материала проводили до основного этапа операции после полного охлаждения организма (группа 3, $T_n = 25^\circ\text{C}$, $n = 5$). Учитывая особенности обеспечения БПГ, когда грудная клетка пациентов остается закрытой до завершения охлаждения организма, общим контролем для двух методов гипотермии служили биоптаты группы 1.

После иссечения все биоптаты немедленно ополаскивали в фосфатном буферном растворе (рН 7.35) и помещали в фиксирующий раствор ($18\text{—}20^\circ\text{C}$), содержащий 2 % параформа и 2.5 % глутаральдегида. Через 1 сут биоптаты разделяли на кубики размером 1 мм^3 и вновь помещали в охлажденный фиксатор на 32 ч. Затем биоптаты промывали в нескольких сменах холодного буферного раствора, обрабатывали в течение 2.5 ч 1%-ным раствором OsO_4 на фосфатном буферном растворе (рН 7.35) и подвергали дегидратации в спиртах возрастающей концентрации (50, 70, 96% и абсолютный спирт) и ацетоне. Заливку проводили в смесь эпоксидных смол (Epon 812, Epon DDSA и Araldite M). Блоки поддерживали в течение 2 ч при комнатной температуре, 4 ч — в термостате при 48°C и 2 сут — при 60°C . Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме фирмы Reichert (Австрия), окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца и анализировали в электронном микроскопе JEM 100CX (JEOL, Япония).

Электронно-микроскопическому исследованию подвергали все сосуды микроциркуляторного русла миокарда, диаметр которых не превышал 25 мкм. Для анализа параметров микропиноцитозного транспорта в каждом случайно выбранном тканевом блоке при начальном увеличении $26\,000\times$ фотографировали 24 фрагмента эндотелия МС, включающего в себя клетки основного типа, светлые и темные. Всего исследовали по 5—7 блоков на каждый этап исследования и от 120 до 168 электронограмм на каждый этап исследования при конечном увеличении негативов $130\,000\times$.

В процессе стереоморфометрического анализа из расчетов исключали участки эндотелиальной поверхности, где плоскость среза считалась не перпендикулярной к плазмалемме. Все идентифицируемые микропиноцитозные везикулы (МПВ) классифицировали на люминальные, базальные и свободные. К двум первым разновидностям относили везикулы, находящиеся в очевидной связи с соответствующим фронтом ЭК, а также везикулы, отстоящие от плазмалеммы на расстоянии их собственного радиуса. Последние учитывали как прикрепленные благодаря способности открываться через горлышко, расположенное вне плоскости среза. Оставшиеся цитоплазматические везикулы обозначали свободными.

Тестовая решетка, применявшаяся для анализа микропиноцитозной активности ЭК, содержала 213 точек и 24 линии длиной 2.5 см. С использованием этой морфометрической системы раздельно для трех разновидностей ЭК определяли численную плотность свободных МПВ в единице объема цитоплазмы (n_b^s/v_s), их объемную плотность (ρ_{bv}), поверхностную плотность везикул, прикрепленных к единице площади люминальной (n_b^l/s_l) и базальной (n_b^b/s_b) поверхности ЭК. Все расчеты производили по формулам (Weibel, 1973) в модификации Караганова и соавторов (1976), разработанной специально для анализа компонентов стенки микрососудов. Статистическую обработку данных с оценкой достоверности различий проводили с помощью *t*-теста Стьюдента.

Результаты

В группе 1 (контроль) внутреннюю выстилку МС формируют пять морфологических разновидностей ЭК: с умеренной плотностью цитоплазмы (или основного типа), светлые, темные, отечные и гиперосмированные. Большинство клеток принадлежит к основному типу, светлые и темные обнаруживаются значительно реже, а отечные и гиперосмированные ЭК выявляются лишь в отдельных МС (табл. 1).

До окклюзии аорты ЭК основного типа, светлые и темные характеризуются широким околядерным пространством и узкой периферической зоной, в составе которой иногда формируются фенестры. Во всех трех разновидностях клеток присутствуют крупные ядра с четкой оболочкой, содержащие сравнительно небольшое количество конденсированного хроматина (рис. 1, *а*). Около ядра локализуются разнообразные органеллы. Митохондрии, как правило, имеют средние размеры и матрикс умеренной электронной плотности с участками просветления. Иногда они образуют скопления, окруженные цистернами гранулярного эндоплазматического ретикула (ГЭР) с крупными рибосомами на мембранах. Аппарат Гольджи (АГ) гиперплазирован и состоит из нескольких комплексов, сформированных полукруглыми цистернами, просвет которых выглядит узким в центре и слегка расширяется в концевых отделах (рис. 1, *б*). Вокруг цистерн группируются многочисленные вакуоли и пузырьки.

Несмотря на сходство, в ультраструктуре ЭК трех морфологических разновидностей выявляется ряд особенностей. К наиболее ярким относится разница в электронной плотности цитоплазмы и микропиноцитозной активности клеток. По данным стереоморфометрического

Таблица 1

Характеристика популяции эндотелиальных клеток микрососудов миокарда при охлаждении пациентов с врожденным дефектом межжелудочковой перегородки в условиях гипотермического искусственного кровообращения и бесперфузионной гипотермии

Группы	Морфологические разновидности эндотелиальных клеток, доля от общего числа на срезе, %, $\bar{x} \pm s_x$				
	основной тип	светлые	темные	отечные	гиперосмированные
1 ($T_{II} = 36-37^\circ\text{C}$)	51.85 ± 1.86	20.22 ± 2.24	26.31 ± 1.95	1.37 ± 0.23	0.25 ± 0.16
2 ($T_{II} = 25^\circ\text{C}$)	37.13 ± 1.41^a	22.63 ± 1.49	31.49 ± 1.42^a	5.21 ± 0.62^a	3.54 ± 0.92^a
3 ($T_{II} = 25^\circ\text{C}$)	48.97 ± 3.35^b	15.09 ± 2.67^b	33.57 ± 2.56^a	0.76 ± 0.45^b	1.61 ± 0.58^a

Примечание. Группа 1 — контроль, группа 2 — охлаждение в условиях гипотермического искусственного кровообращения, группа 3 — охлаждение в условиях бесперфузионной гипотермии. ^a Различия с группой 1 (контроль) значимы при $P < 0.05$, ^b Различия с группой 2 значимы при $P < 0.05$. T_{II} — температура в пищеводе.

анализа, самую высокую численность свободных и прикрепленных везикул имеют темные клетки, обладающие электронно-плотным матриксом цитоплазмы (рис. 1, в). Самое низкое количество свободных и прикрепленных МПВ демонстрируют светлые ЭК, отличающиеся малочисленностью и нерегулярным распределением всех внутриклеточных органелл. ЭК основного типа характеризуются промежуточными значениями численной, объемной и поверхностной плотности МПВ (табл. 2).

Следует отметить, что во всех трех разновидностях ЭК свободные и прикрепленные МПВ имеют тенденцию к слиянию, в результате чего в цитоплазме и на противоположных фронтах клеток формируются мультивезикулярные комплексы, состоящие из 2—8 везикул, отделенных друг от друга одноконтурной мембраной (рис. 1, з).

Общая архитектура отечных и гиперосмированных ЭК резко изменена. Электронно-прозрачная цитоплазма первых глубоко выступает в просвет МС и содержит отдельные органеллы с признаками повреждения ультраструктуры. Общей тенденцией являются выраженное набухание ядер и митохондрий, расширение каналов ГЭР, вакуолизация и редукция АГ. Гиперосмированные клетки, напротив, истончены и в их осмиофильной цитоплазме почти не удается отдифференцировать каких-либо органелл. С учетом особенностей ультраструктуры и низкого представительства этих ЭК на всех этапах операции анализа их транспортной системы не проводили.

В биоптатах группы 2, полученных у пациентов, охлажденных в условиях гипотермического ИК, эндотелиальная выстилка МС правого предсердия имеет иную композицию, чем в контроле. В ней достоверно ($P < 0.05$) уменьшается число ЭК основного типа, тогда как доля клеток с резко измененной морфологией (отечных и гиперосмированных) увеличивается, хотя общий объем эндотелия, подвергающегося деструкции по типу коагуляционного и коагуляционного некроза, остается незначительным. На фоне перечисленных изменений в эндотелии МС регистрируется рост числа темных ЭК при сохранении количества светлых клеток на уровне этапа нормотермии (табл. 1).

Ультраструктура ЭК основного типа, светлых и темных варьирует. Превалируют клетки, сохранившие морфологию, не отличающуюся от контроля. Тем не менее в общей совокупности ЭК основного типа и особенно светлых обособляются группы клеток, для которых ха-

рактерны широкие профили, наличие участков цитоплазмы, лишенных органелл и цитогранул, присутствие ядер с просветленной кариоплазмой. Кроме того, в них выявляются локально или полностью набухшие митохондрии без крист, вакуолизированный АГ и ГЭР. В таких ЭК происходят накопление миелиноподобных структур и формирование отечных выступов люминальной поверхности ЭК, подвергающихся отторжению в просвет МС.

Темные клетки отчетливо подразделяются на две подгруппы. Первая не отличается от типичных темных ЭК, тогда как клетки второй подгруппы близки к гиперосмированным. Их контуры истончены, ядра резко уплотнены и окружены кариолеммой со слабоотечным перинуклеарным пространством (рис. 2, а). Митохондрии имеют полностью набухший матрикс и не содержат крист. АГ формируют цистерны с дилатированными просветами, заполненными электронно-прозрачным содержимым. Вокруг цистерн располагаются единичные пузырьки. Каналы ГЭР не расширены, но малочисленны и содержат относительно небольшое число прикрепленных рибосом. Вдоль контура плазмалеммы появляются нечеткие участки.

Данные стереоморфометрического анализа свидетельствуют о том, что в ЭК основного типа число МПВ, прикрепленных к единице площади люминальной и базальной поверхностей клеток, не имеет статистически значимых различий с контролем (рис. 2, б). Объемная плотность везикул достоверно выше, чем в условиях нормотермии, а численная плотность МПВ, напротив, ниже (табл. 2). В светлых ЭК число везикул, прикрепленных к единице люминальной поверхности ЭК, достоверно ($P < 0.05$) увеличивается по сравнению с контролем. На базальном контуре плотность прикрепленных везикул не имеет достоверных различий с периодом нормотермии. Объемная плотность свободных везикул в условиях гипотермического ИК достоверно ($P < 0.05$) возрастает при снижении их численной плотности (табл. 2). В темных ЭК в среднем по группе число МПВ, прикрепленных к единице люминальной поверхности клеток, не отличается от контроля, тогда как число везикул, прикрепленных к единице базальной поверхности ЭК, достоверно ($P < 0.05$) снижается. Численная плотность свободных МПВ уменьшается, в то время как их объемная плотность не меняется по сравнению с контролем (табл. 2).

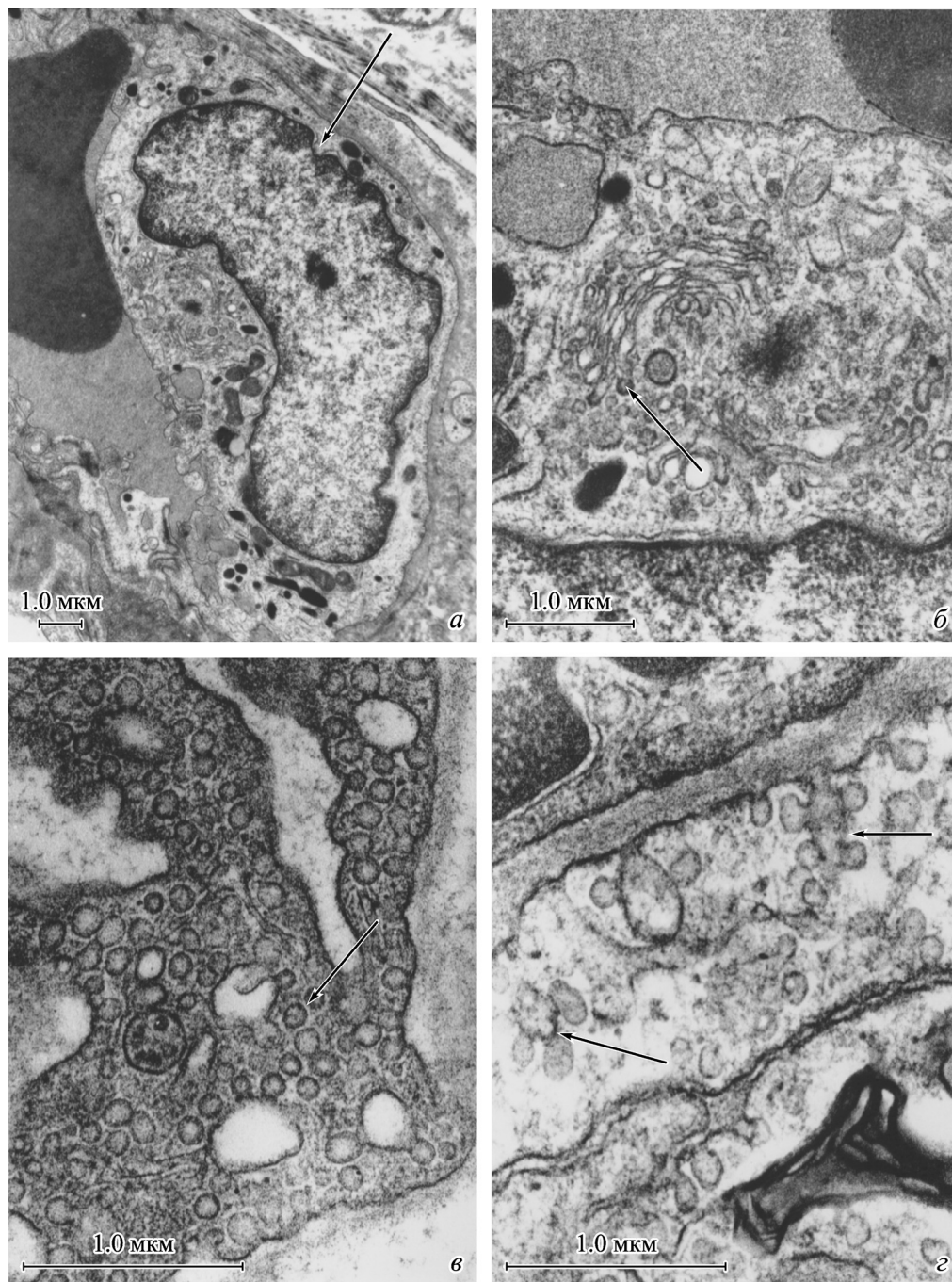


Рис.1. Ультраструктура эндотелия микрососудов миокарда правого предсердия пациента с дефектом межжелудочковой перегородки до коррекции порока при 36—37 °С.

а — крупное ядро эндотелиальной клетки основного типа с четкой оболочкой, содержащее сравнительно небольшое количество конденсированного хроматина (*стрелка*); *б* — полукруглые цистерны комплекса Гольджи неравномерной ширины, концевые отделы которых содержат электронно-плотный материал (*стрелка*); *в* — многочисленные свободные и прикрепленные микропиноцитозные везикулы в темной эндотелиальной клетке (*стрелка*); *г* — мультивезикулярные комплексы, свободно расположенные в цитоплазме и прикрепленные к плазмалемме светлой эндотелиальной клетки (*стрелки*).

В биоптатах группы 3, полученных у пациентов, охлажденных в условиях БПГ, большинство ЭК, как и в контроле, принадлежит к основному типу. Число светлых и отечных ЭК невелико, но доля темных и гиперсморванных клеток выше, чем в контроле (табл. 1).

Подавляющая часть ЭК основного типа имеет общую архитектуру и субклеточную организацию, отличающуюся от контроля. Такие клетки характеризуются

ярко выраженными перепадами толщины цитоплазмы в районах, удаленных от ядра. При этом в зонах локального расширения периферических отделов клеток наблюдаются участки резкого просветления цитоплазмы. В ультраструктуре ядерного аппарата ЭК также обнаруживаются принципиальные различия с контролем. Они проявляются в формировании локусов расширения перинуклеарного пространства и увеличении в кариоплазме

Таблица 2

Микропиноцитозная активность трех морфологических разновидностей эндотелиальных клеток миокарда при охлаждении пациентов с врожденным дефектом межжелудочковой перегородки в условиях гипотермического искусственного кровообращения и бесперфузионной гипотермии ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группы	n_b^c/v_3 (везикул/ μ^3)			ρ_{Π}		
	ОК	СК	ТК	ОК	СК	ТК
1 ($T_{\Pi} = 36^{\circ}\text{C}$)	391.9±19.6	200.2±6.9	675.4±2.4	0.18±0.01	0.09±0.01	0.31±0.01
2 ($T_{\Pi} = 25^{\circ}\text{C}$)	156.6±9.0 ^a	98.6±5.1 ^a	195.1±7.7 ^a	0.22±0.01 ^a	0.14±0.01 ^a	0.27±0.03
3 ($T_{\Pi} = 25^{\circ}\text{C}$)	132.9±15.9 ^a	75.8±4.5 ^{a,б}	186.2±8.0 ^a	0.13±0.01 ^{a,б}	0.080±0.003 ^{a,б}	0.18±0.01 ^{a,б}

Группы	n_b^A/s_A (*везикул/ μ^2)			n_b^B/s_B (везикул/ μ^2)		
	ОК	СК	ТК	ОК	СК	ТК
1 ($T_{\Pi} = 36^{\circ}\text{C}$)	93.5±7.8	48.2±6.6	104.5±7.4	154.5±14.7	85.9±12.3	174.2±11.2
2 ($T_{\Pi} = 25^{\circ}\text{C}$)	83.9±8.7	68.4±3.9 ^a	95.6±8.4	118.1±11.9	92.4±7.1	127.5±8.0 ^a
3 ($T_{\Pi} = 25^{\circ}\text{C}$)	27.4±5.9 ^{a,б}	18.8±1.6 ^{a,б}	34.6±6.8 ^{a,б}	65.0±8.8 ^{a,б}	37.0±2.5 ^{a,б}	70.1±8.9 ^{a,б}

Примечание. ОК — ЭК основного типа, СК — светлые ЭК, ТК — темные ЭК; n_b^c/v_3 — число свободных везикул в единице объема ЭК; ρ_{Π} — объемная плотность; n_b^A/s_A , n_b^B/s_B — число везикул, связанных с единицей поверхности люминального и базального контуров ЭК соответственно. ^a Различия с группой 1 (контроль) значимы при $P < 0.05$, ^б Различия с группой 2 значимы при $P < 0.05$.

количества глыбок плотного хроматина, расположенного на периферии и в центре, а также в сохранении в ультраструктуре ядрышек исключительно фибриллярного компонента. Хотя мелкие митохондрии сохраняют матрикс умеренной электронной плотности и четкие оболочки, одновременно с ними выявляются крупные органеллы без крист, с локально или полностью просветленным матриксом. АГ в большинстве ЭК основного типа демонстрирует признаки редукции. Пластинчатые комплексы формируются нерасширенными мелкими цистернами с хорошо дифференцирующимся просветом (рис. 3, а) или группой вакуолей, окруженных пузырьками, среди которых изредка отмечаются окаймленные. ГЭР представлен отдельными каналами с расширенным интрацеллюлярным пространством и резко сниженным числом прикрепленных рибосом.

В отличие от ЭК основного типа ультраструктура большинства светлых клеток сходна с контролем. Несмотря на это, в их общей совокупности выявляются клетки с широкими профилями, содержащие скопления миелоноподобных телец (рис. 3, б). В таких ЭК ядра обладают резко просветленной кариоплазмой, митохондрии имеют электронно-прозрачный матрикс и лишены крист. Цистерны АГ и каналы ГЭР укорочены и расширены.

Ультраструктура темных ЭК в группах 2 и 3 принципиально не различается, хотя клетки, морфологически приближающиеся к гипертрофированным, в группе 3 регистрируются чаще.

По данным стереометрического анализа, при охлаждении пациентов в условиях БПГ в единице объема ЭК основного, светлого и темного типов выявляется достоверно ($P < 0.05$) более низкое число свободных МПВ по сравнению с контролем (табл. 2). Число вези-

кул, связанных с базальной и люминальной поверхностями клеток этих разновидностей, а также доля объема, занимаемого свободными везикулами в цитоплазме ЭК, ниже, чем в контроле (табл. 2).

Обсуждение

Итак, при нормальной температуре тела эндотелий МС правого предсердия пациентов, страдающих ДМЖП, главным образом состоит из клеток основного типа. Это свидетельствует о сохранении резерва адаптации эндотелия коронарных МС в условиях функциональной нагрузки на правые отделы сердца, так как в норме указанная морфологическая форма численно превосходит все другие разновидности ЭК (Чернух и др., 1975). На субмикроскопическом уровне компенсаторная перестройка микрососудистого эндотелия проявляется в гипертрофии ядра, гиперплазии АГ, активации гранулопродуцирующей функции ЭК в совокупности с разрастанием сети каналов ГЭР, а также в слиянии МПВ в гроздь и розетки, что считается признаком усиления транспорта макромолекул через стенку МС (Самойлов и др., 2000). Дистрофические изменения эндотелия коронарных МС носят ограниченный характер.

Анализ интенсивности микропиноцитозного транспорта, проведенный у детей с ДМЖП, демонстрирует редукцию численной плотности свободных МПВ во всех разновидностях ЭК по сравнению с условной нормой, установленной при нормотермии у экспериментальных животных (Kazanskaya et al., 1999). Это позволяет рассматривать торможение микровезикулярной активности в трех разновидностях ЭК в качестве ультраструктурно-

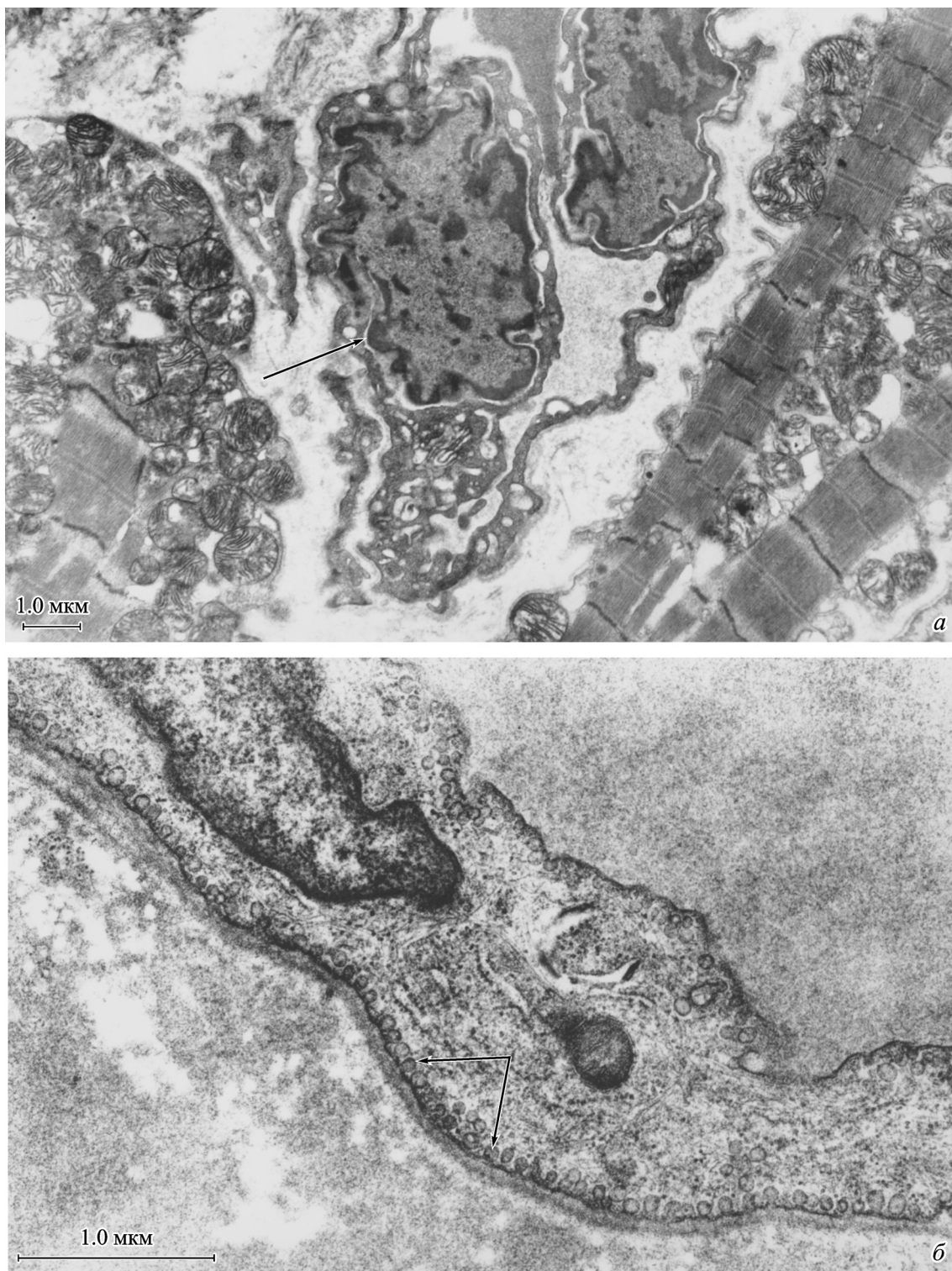


Рис. 2. Ультраструктура эндотелия микрососудов правого предсердия пациента с дефектом межжелудочковой перегородки на этапе охлаждения при коррекции порока в условиях гипотермического искусственного кровообращения.

а — уплотненные ядра в темных клетках с нетипичной общей архитектурой, близкой к гиперсмированным эндотелиальным клеткам (стрелка);
б — многочисленные микропиноцитозные везикулы, прикрепленные к базальной поверхности эндотелиальной клетки основного типа (стрелки).

го механизма формирования капилляротрофической недостаточности сердца при врожденном пороке. Феномен капилляротрофической недостаточности, ранее установленный методом световой микроскопии, на тканевом уровне структурной организации миокарда проявляется

в редукции истинных капилляров с заменой их на сосуды емкостного типа (Ярыгин и др., 1996). В то же время повышенный энергетический запрос миокарда в условиях его компенсаторной гипертрофии находит свое отражение в изменении популяционного состава эндотелия

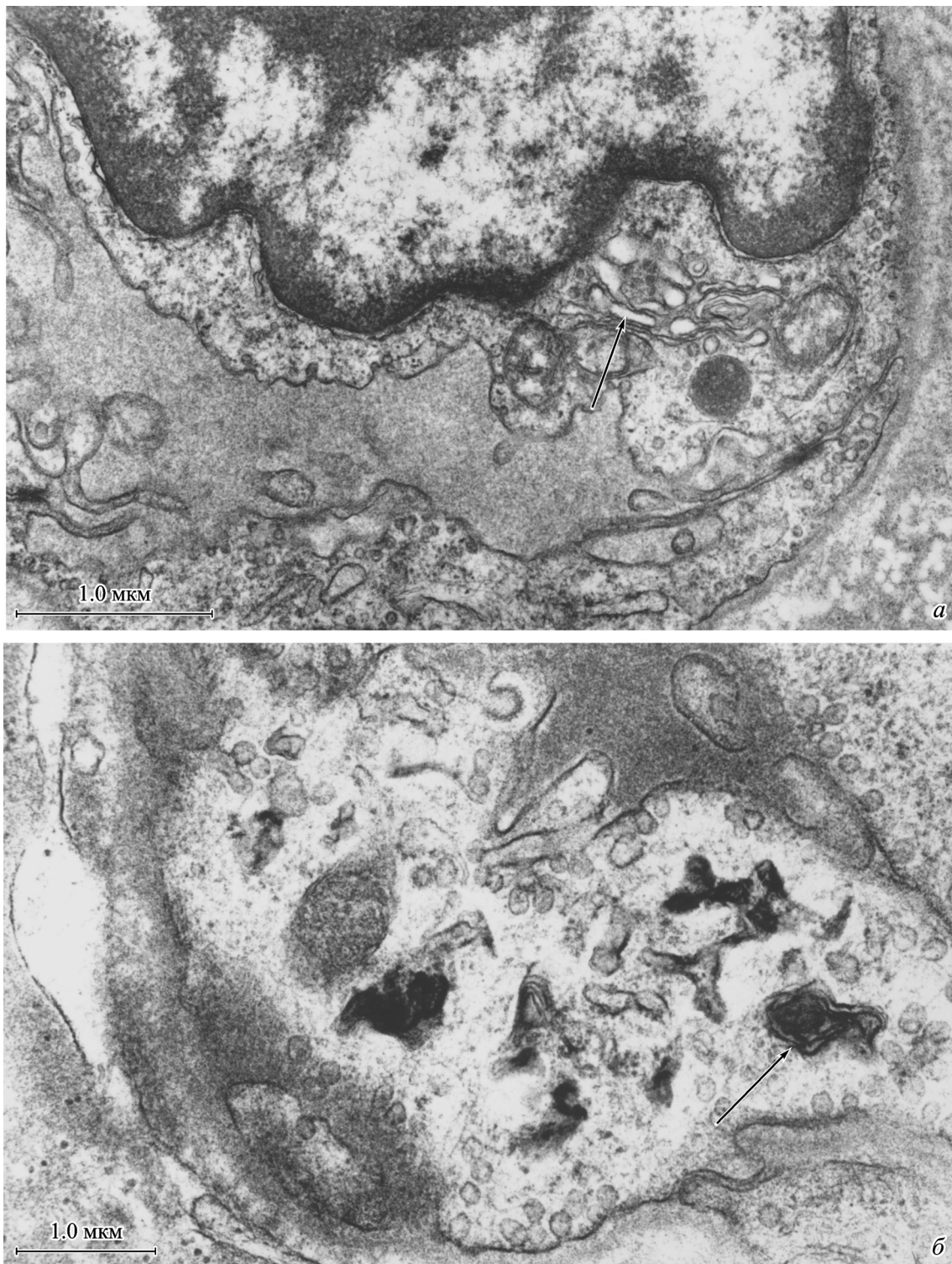


Рис. 3. Ультраструктура эндотелия микрососудов правого предсердия пациента с дефектом межжелудочковой перегородки на этапе охлаждения при коррекции порока в условиях бесперфузионной гипотермии.

а — цистерны пластинчатого комплекса мелких и средних размеров с хорошо видимым просветом в цитоплазме клетки основного типа (*стрелка*);
б — скопление миелоноподобных телец в цитоплазме светлой эндотелиальной клетки (*стрелка*).

МС, где регистрируется повышение доли транспортно-активных темных ЭК на 5—10 % по сравнению с условной нормой (Volkov et al., 1996).

Охлаждение пациентов с ДМЖП в условиях гипотермического ИК сопровождается ростом комплекса дистрофических изменений в эндотелии МС, что проявля-

ется в достоверном уменьшении доли ЭК основного типа в общей клеточной популяции. При охлаждении детей в условиях БПГ число клеток основного типа сохраняется высоким, превышая в 1.3 раза их количество, установленное в условиях гипотермического ИК. Кроме того, доля необратимо измененных отечных и гиперосмиро-

ванных клеток при БПГ соответственно в 6.9 и 2.2 раза ниже, чем в условиях гипотермического ИК.

Хотя считается, что набухание клеток вместе со своими органеллами происходит при температуре ниже 15 °С (Tveita et al., 1998), в настоящем исследовании было показано, что в условиях гипотермического ИК признаки отека эндотелия регистрируются уже при 25 °С. Анестезиологическое обеспечение операций под защитой БПГ при том же уровне общей гипотермии не сопровождается развитием в ультраструктуре МС признаков распространяющегося отека ЭК. Полученный результат согласуется с данными других авторов, показавших, что выход ионов натрия из клетки при иммерсионной гипотермии преобладает над входом (Gizewski et al., 1997).

Разница данных, полученных при гипотермическом ИК и БПГ, может быть обусловлена множеством составляющих. Они включают в себя индивидуальное и коллективное влияние гипотермической перфузии на механизмы регуляции клеточного объема, основной состав перфузата и концентрацию калия в нем, стратегию управления рН, агенты для анестезии, а также скорость и глубину изменений перфузионной температуры. Все эти параметры могут изменять ответ миокарда в течение процедуры гипотермического ИК (Fantini et al., 1987) по сравнению с условиями БПГ.

Проведенное исследование демонстрирует, что защита миокарда с помощью БПГ сопровождается появлением в эндотелии МС ультраструктурных признаков уменьшения метаболического запроса. Это согласуется с данными исследований, показавших снижение в 2.5—3.0 раза интенсивности трофики миокарда при бесперфузионном охлаждении организма до 25 °С (Литасова и др., 1988).

В условиях ИК изменения ультраструктуры органелл, принимающих участие во внутриклеточных синтезах, в сторону их гипофункции проявляются существенно слабее. Причиной сохранения при гипотермическом ИК относительно высокого уровня метаболической активности эндотелия МС может быть потребность продолжения наработки ряда биологически активных веществ, участвующих в эндотелийзависимой регуляции процессов вазоконстрикции—вазодилатации. Известно, что условия ИК сопровождаются увеличением в крови концентрации вазопрессина в 100 раз (Blackstone et al., 1992), что требует адаптационной активации механизмов вазодилатации, участвующих в нейтрализации указанного стрессорного влияния. В частности, возникает необходимость усиления наработки эндотелийзависимого релаксирующего фактора (EDRF), синтез которого осуществляется в клетках сосудистого эндотелия (Chang et al., 1997).

Обращают на себя внимание и особенности реакций специфических органелл сосудистого эндотелия на различные способы охлаждения. Так, снижение температуры тела в условиях гипотермического ИК не сопровождается достоверным изменением поверхностной плотности везикул, прикрепленных к единице поверхности ЭК, по сравнению с доокклюзионным этапом операции при нормотермии. Расчеты объемной плотности микровезикул, расположенных свободно в цитоплазме ЭК основного типа, светлых и темных ЭК, также подтверждают более высокую микропиноцитозную активность эндотелия МС при ИК по сравнению с БПГ. Выявляемое при этом уменьшение числа свободных МПВ, скорее всего, связано с увеличением размеров микровезикул, так как измене-

ний их объемной плотности не отмечается. Указанные изменения характеристик диссипативного трансэндотелиального транспорта в ЭК при гипотермическом ИК могут быть обусловлены высокой скоростью перфузионного охлаждения, а также метаболическим запросом миокарда на фоне холодового ангиоспазма.

Параметры микропиноцитозного транспорта в группе БПГ демонстрируют соответствие между относительно низкой плотностью везикул, свободно расположенных в цитоплазме, и числом везикул, прикрепленных к люминальному и базальному контурам ЭК. Это свидетельствует об ингибирующем влиянии иммерсионного охлаждения на формирование везикул и их трансклеточный перенос путем перевода плазматических мембран из липидно-гелевого состояния в более ригидное липидно-кристаллическое (Wagner, Casley-Smith, 1981). Ограничение диссипативного переноса молекул в условиях БПГ может компенсироваться интенсификацией соединительного переноса за счет трансформации эндотелия соматического типа в фенестрированный.

Таким образом, гетерогенный ответ различных внутриклеточных процессов в эндотелии МС миокарда при гипотермическом ИК и БПГ обеспечивает не собственно фактор охлаждения, а метод, с помощью которого обеспечивается снижение температуры организма. В условиях БПГ и сравнительно медленного темпа охлаждения морфологические признаки торможения метаболизма эндотелиальных клеток выявляются параллельно количественной редукции показателей их микропиноцитозного транспорта. В условиях ИК влияние температурных изменений на клеточную физиологию усложняется, приводя к увеличению дисбаланса различных энзиматически-контролируемых процессов и дезинтеграции метаболических путей. Это обуславливает разницу в ультраструктуре эндотелия МС при гипотермическом ИК и БПГ, отражающую запаздывание при первом способе процесса адаптационного торможения метаболизма клеток с сохранением в ЭК активности органелл, участвующих во внутриклеточных синтезах и трансэндотелиальном переносе макромолекул.

Список литературы

- Бураковский В. И., Бокерия Л. А. 1989. Общие вопросы сердечно-сосудистой хирургии. В кн.: Сердечно-сосудистая хирургия. М.: Медицина. 11—42.
- Караганов Я. Л., Ашимов Г. А., Гусев С. И. 1976. Ультраструктурная морфометрия обменных сосудов. В кн.: Вопросы структурной организации и взаимодействия элементов в системе микроциркуляции. М.: Изд-во 2-го Москов. мед. ин-та им. Н. И. Пирогова. 7—26.
- Литасова Е. Е., Ломиворотов В. Н., Постнов В. Г. 1988. Бесперфузионная глубокая гипотермическая защита. Новосибирск: Наука. 205 с.
- Самойлов К. О., Шкуруний В. А., Верецагина Г. Н. 2000. Цитоморфологические аспекты хронического катарального гингивита при дисплазии соединительной ткани. Новосибирск: Изд-во НГМА. 176 с.
- Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. 1975. Микроциркуляция. М.: Медицина. 456 с.
- Шереметьева Г. Ф., Иванова А. Г. 1997. Эндотелий капилляров миокарда больных ишемической болезнью сердца при аортокоронарном шунтировании в условиях фармакологической и тепловой кардиопротекции. Вестн. РАМН. 11 : 35—39.
- Ярыгин Н. Е., Николаева Т. Н., Кораблев А. В. 1996. Капилляротрофическая недостаточность системы микрогемодиализации

ляции как одно из проявлений общей патологии. Арх. патол. 1 : 41—46.

Barkalow F. J., Goodman M. J., Gerritsen M. E., Mayadas T. N. 1996. Brain endothelium lack one of two pathways of p-selectin-mediated neutrophil adhesion. *Blood.* 88 : 4585—4593.

Blackstone E. N., Kirklin J. W., Stewart R. W. 1992. Noninvasive estimation of total body water in critically ill children after cardiac operations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 104 : 585—589.

Chang C. H., Lin P. J., Chu Y., Lee Y. S. 1997. Impaired endothelium-dependent relaxation after cardiac global ischemia and reperfusion: role of warm blood cardioplegia. *Amer. Coll. Cardiol.* 29 : 681—687.

Fantini G. A., Zadeh B. J., Chiao J., Krieger K. H., Isom O. W., Shires G. T. 1987. Effect of hypothermia on cellular membrane function during low flow extracorporeal circulation. *Surgery.* 102 : 132—139.

Gizewski E. R., Rauhen U., Kirsch M., Renters I., Diedrichs H., Groot H. D. 1997. Rapid decrease in cellular sodium and chloride content during cold incubation of cultured liver endothelial cells and hepatocytes. *Biochem. J.* 322 : 693—699.

Ignarro L. J. 1989. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 3 : 31—36.

Kayashima K., Kudo H., Doi Y., Fujimoto S. 1998. The role of endothelin-1 in regulation of rat mesenteric microcirculation. *Cardiovasc. Pharmacol.* 31 : S126—S127.

Kazanskaya G. M., Volkov A. M., Karas'kov A. M., Lomivorotov B. N., Shun'kin A. V. 1999. Experimental studies on the endo-

thelium of heart capillaries under moderate (28—30 °C) and deep (22—24 °C) hypothermia without perfusion. *Microvasc. Res.* 58 : 250—267.

Ning X. H., Xu C. S., Song Y. C., Xiao Y., Hu Y. J., Lupineti F. M., Portman M. A. 1998. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Amer. J. Physiol.* 274 : H786—H793.

Sun L. S., Adams D. C., Delphin E., Graham J., Meltzer E., Rose E. A., Heyer E. J. 1997. Sympathetic response during cardiopulmonary bypass: mild versus moderate hypothermia. *Crit. Care Med.* 25 : 1990—1993.

Tveita T., Myklebust R., Ytrehus K. 1998. Changes in myocardial ultrastructure induced by cooling as well as rewarming. *Res. Exp. Med. (Berlin).* 197 : 243—254.

Volkov A. M., Kazanskaya G. M., Karas'kov A. M., Shun'kin A. V. 1996. An approach to a definition of the limits of adaptive reorganization of capillary endothelium in ischemic myocardium based on ultrastructural analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 793 : 423—426.

Wagner R. C., Casley-Smith J. R. 1981. Endothelial vesicles. *Microvasc.* 21 : 267—298.

Weibel E. R. 1973. Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: Principles and techniques of electron microscopy. New York: Von Nostrand-Reinhold. 3 : 237—296.

Поступила 27 II 2006

SOME FEATURES OF ENDOTHELIAL ULTRASTRUCTURE OF MYOCARDIUM MICROVESSELS AFFECTED BY VARIOUS METHODS OF ARTIFICIAL HYPOTHERMIA

G. M. Kazanskaya

Research Institute of Circulation Pathology after Yu. N. Meshalkin,
Federal Health Care & Social Development Agency, Novosibirsk

A comparative analysis of the endothelial ultrastructure of myocardium microvessels affected by various methods of artificial hypothermia was carried out. Tissue samples were harvested in children with a congenital ventricular septum defect after cooling the whole body under the conditions of hypothermic artificial circulation and perfusionless (immersion) hypothermia. It was found out that the shifts in population composition of endothelial cells, as well as the changes in the ultrastructure of organelles participating in endocellular syntheses and transendothelial transfer of macromolecules depended upon the rate body cooling. Under perfusionless hypothermia and of moderately low cooling rate, morphological signs of inhibition of endothelial cells metabolism were observed alongside with quantitative reduction of their micropinocytic transport indicators. Under hypothermic artificial circulation these reactions tended to lag behind due to the high cooling rate that initiates a heterogeneous response of various endothelial processes to the changes of body temperature.