

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ L-NAME ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

А. В. Шилов², М. В. Мнихович^{1, 2, 3}, Р. Е. Калинин¹, И. А. Сучков¹, Л. В. Кактурский²

¹ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова,

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»², г. Москва,

³ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, г. Москва

В статье проведена оценка морфологических изменений в сосудистой стенке, а в частности в эндотелии при моделировании L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции. Показано, что к 7-м суткам опыта, от начала экспериментального введения N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME), развиваются изменения субмикроскопической архитектоники эндотелиальных клеток, в результате чего возникает эндотелиальная дисфункция. Ведущим звеном в развитии патологии сосудов на ультраструктурном уровне является митохондриальная недостаточность эндотелиоцитов. Выбранная методика L-NAME индуцированной эндотелиальной патологии отличается высокой воспроизводимостью и адекватными результатами.

Ключевые слова: экспериментальное моделирование, морфологическая оценка, L-NAME индуцированная эндотелиальная патология, ультраструктура, эндотелий.

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF EXPERIMENTAL MODEL OF L-NAME INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

A. V. Shilov², M. V. Mnihovich^{1, 2, 3}, R. E. Kalinin¹, I. A. Suchkov¹, L. V. Kakturskiy²

¹Ryazan State Medical University named after Academician Pavlov,

²Scientific-Research Institute of Human Morphology,

³Medical University Russian National Research Medical University Ministry of Health of Russia

The article assess morphological changes in the vascular wall, and in particular in modeling in the endothelium of L-NAME induced endothelial dysfunction. It is shown that for 7 days of the experience, he starts a pilot injection N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), develop changes submicroscopic architectonic endothelial cells, resulting in endothelial dysfunction occurs. The leading element in the development of vascular diseases at the ultrastructural level is mitochondrial failure of endothelial cells. The selected method of L-NAME-induced endothelial pathology is characterized by high reproducibility and adequate results.

Key words: experimental modeling, morphological assessment, L-NAME-induced endothelial pathology, ultrastructure, endothelium.

Роль дисфункции эндотелия в прогрессировании атеросклероза и развитии гиперплазии интимы не вызывает сомнений и в настоящее время функциональному состоянию эндотелия (ФСЭ) придается большое значение в изучении этиологии, патогенеза облитерирующего атеросклероза, прогрессировании заболевания, развитии осложнений [1, 2, 7]. По мнению ряда авторов, основное звено патогенеза рестеноза зоны сосудистых анастомозов — это дисфункция эндотелия [1, 2]. Основным активным метаболитом, определяющим функциональное состояние эндотелия, большинство авторов признает оксид азота (II) (NO), являющийся локальным тканевым гормоном с множественными эффектами — от противовоспалительного до сосудистых эффектов и стимуляции ангиогенеза [3, 4, 5]. Также в комплексной оценке ФСЭ целесообразно учитывать компоненты перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты [3, 5]. Одним из проявлений эндотелиальной дисфункции в послеоперационном периоде является гиперплазия неоинтимы в зоне реконструкции [6, 7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить эффективность экспериментального моделирования и механизмы развития L-NAME-индуцированной эндотелиальной патологии.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 10 беспородных кошках, массой от 3,0 до 4,5 кг. Все работы проводились в соответствии с этическими нормами, руководствуясь правилами и приказами: «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г., Животные содержались в стандартных условиях вивария, получали стандартный рацион питания и воду *ad libitum*.

Моделирование L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции осуществлялось путем введения в течение 7 дней N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) один раз в сутки внутривентриально в дозе 25 мг/кг.

Животных выводили из эксперимента через 3, 5 и 7-е сут. Умерщвление животных проводили передози-

ровкой золетила («Virbac Sante Animale», Франция), вводимого внутримышечно в дозе 50 мг/кг.

Выделенный сосудистый ствол фиксировали в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина (фосфатный буфер, pH = 7,2—7,4), обезвоживали в серии этанолов возрастающей концентрации, с применением изопропанола, заливали в парафин. Изготавливали тотальные серии срезов (10 мкм), которые окрашивали гематоксилином и эозином («Biovitrum», Россия). Гистологические срезы также окрашивали пикрофуксином по ван Гизону и по методу Маллори по общепринятой методике.

Морфологическое исследование проводили с помощью микроскопа Leica DMI 4000 B с видеозахватом камерой Leica.

Для проведения трансмиссионной электронной микроскопии, фрагменты сосудистой стенки фиксировали в 2,5%-м растворе глутаральдегида («Fluka», Швейцария) с постфиксацией в 1%-м растворе OsO₄ («Fluka», Швейцария). Контрастирование проводили 2,5%-м спиртовым раствором (70% этиловый спирт) уранила ацетата («Fluka», Швейцария). Подготовленные кусочки заливали в смесь смол Эпона и Аралдита М («Fluka», Швейцария). Полутонкие срезы окрашивали азуром II и эозином. Ультратонкие срезы дополнительно контрастировали солями свинца и уранилацетатом по Рейнольдсу (Уикли Б., 1975 г.). Изучение препаратов проводили на трансмиссионном электронном микроскопе «Libra 120» с автоматическим сканированием изображений («Carl Zeiss», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 3-и сутки от начала опыта морфологическая и ультраструктурная картина была практически однотипной.

При световой микроскопии препаратов отмечалось наличие дистрофических и некробиотических изменений в стенке сосуда, выраженный интерстициальный отек, сглаживание эндотелиальной выстилки, истончение эндотелия, сморщивание эндотелиоцитов, а во многих местах и вообще отсутствие эндотелиальной выстилки в просвете сосуда. В субэндотелиальном слое наблюдается набухание волокон, интерстициальный отек, стертость внутренней эластической мембраны, ее базофилия, сегментация эластических волокон.

При ультраструктурной оценке отмечается наличие дистрофических и деструктивных изменений органелл. Ядра эндотелиоцитов имели фестончатый вид (рис. 1).

Ядерная мембрана образовывала глубокие инвагинации, теряла четко контурированную структуру, была разрыхлена. Перинуклеарные пространства неравномерно расширены. Ядерный хроматин находился преимущественно в конденсированном состоянии. Его осмиофильные глыбки плотным кольцом концентрировались вдоль ядерной мембраны. Центральная часть матрикса ядра содержала гранулы деконденсированного хроматина и обладала низкой электронной плотностью. Цитоплазма в перинуклеарной области имела более высокую электронную плотность, в ней присутство-

вало небольшое количество деструктивно измененных органелл (рис. 2).

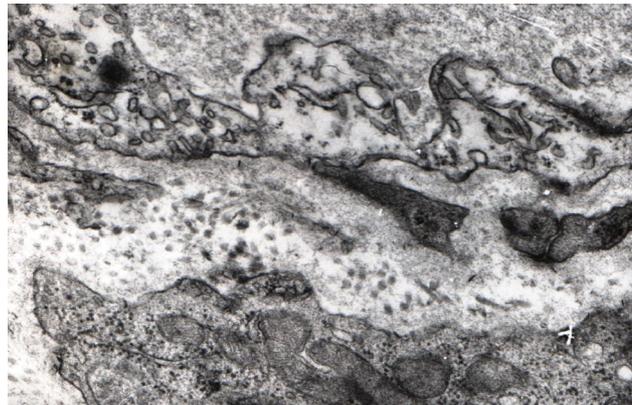


Рис. 1. Дистрофические и деструктивные изменения органелл. Ядра эндотелиоцитов фестончатого вида

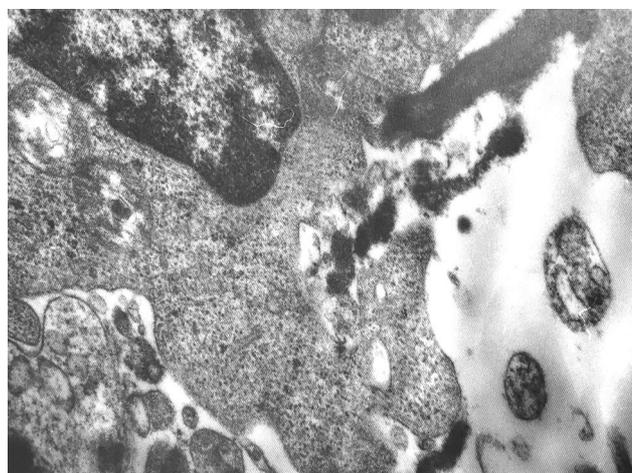


Рис. 2. Гомогенный матрикс митохондрий, лизированные крипты, деструкция наружных мембран

Митохондрии эндотелиоцитов обладали средней электронной плотностью и гомогенным матриксом. Кристы значительного числа митохондрий не выявлялись. Отдельные митохондрии содержали totally lysosomal cristae and coarse-fibrous matrix. Наружные мембраны имели очаги деструкции (рис. 3).

Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулаума были сильно расширены и представляли собой электронно-прозрачные вакуоли. На мембранах практически отсутствовали рибосомы, а в цитоплазме выявлялось большое количество рибосом и полисом. Гиалоплазма эндотелиоцитов была умеренно просветлена. Наблюдался очаговый лизис мембран гранулярной эндоплазматической сети. Пластический цитоплазматический комплекс Гольджи был подвержен редукции и представлен отдельно лежащими, беспорядочно ориентированными гладкими мембранами, вблизи которых располагались крупные электронно-прозрачные вакуоли, первичные и вторичные лизосомы, а также включения липидов.

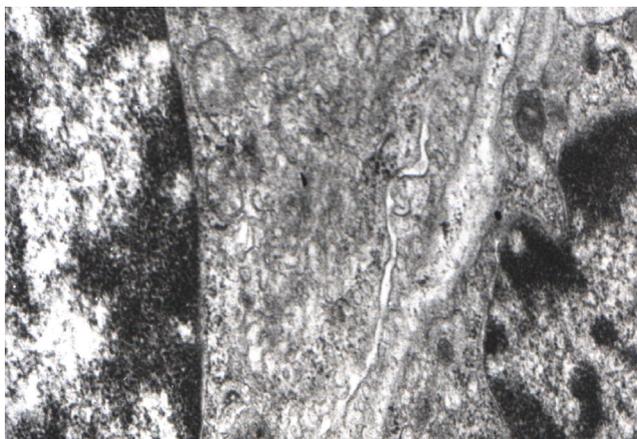


Рис. 3. Гиалоплазма эндотелиоцитов умеренно просветлена, очаговый лизис мембран гранулярной эндоплазматической сети, комплекс Гольджи с признаками редукции

Таким образом, к 3-м суткам происходит наличие выраженных глубоких дистрофических изменений, затрагивающих все структурные элементы сосудов, в особенности эндотелий, что запускает стойкий процесс его дисфункциональных изменений.

На 5-е и 7-е сутки морфологическая и ультраструктурная картина была однотипной, но отличалась от таковой в период 3-х суток.

При световой микроскопии отмечено, что претерпевают изменения все слои сосуда, от интимы, до адвентиции. Интима рельефная, резко утолщена, за счет отека, с выраженными дистрофическими изменениями и наличием разволокнения волоконного каркаса, что создает наличие оптически пустых ячеек, признаки плазморрагии. Эндотелий неравномерно расположенный, с набуханием отдельных клеток. Внутренняя эластическая мембрана неравномерно утолщена, с наличием глубоких складок и фрагментацией.

Средняя оболочка и адвентиция с явлениями мозаичной пикрино и фуксинофилии, эластический компонент фрагментирован, с набуханием волокон и нередкими фигурами деформации волоконного каркаса. Адвентиция, преимущественно вокруг собственных сосудов очагово гипертрофированна, с наличием лимфоцитозитарной инфильтрацией, с примесью эозинофилов, преимущественно вокруг собственных сосудов.

На 7-е сутки в адвентиции изменения более выражены. Хотя, эндотелий утолщен, на многих участках сдушен, субэндотелиальный слой набухший, стертость внутренней эластической мембраны, ее базофилия, сегментация эластических волокон. В адвентиции определяется полнокровие и кровенаполнение капилляров адвентиции и гиперхромазией эндотелия капилляров, в некоторых сосудах адвентиции лейкоцитоз и эритродиapedез. Основное вещество адвентиции и средней оболочки с базофилией, сегментарными разрывами коллагеновых фибрилл, формированием концентрических структур.

При ультраструктурном исследовании отмечается эндотелиоциты с тотальной деструкцией всех внутриклеточных органелл и мембранных структур (рис. 4, 5).

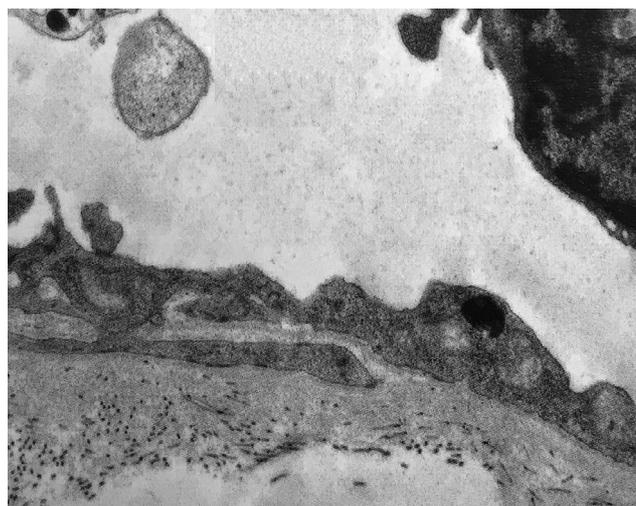


Рис. 4. Эндотелиоциты с тотальной деструкцией всех внутриклеточных органелл и мембранных структур

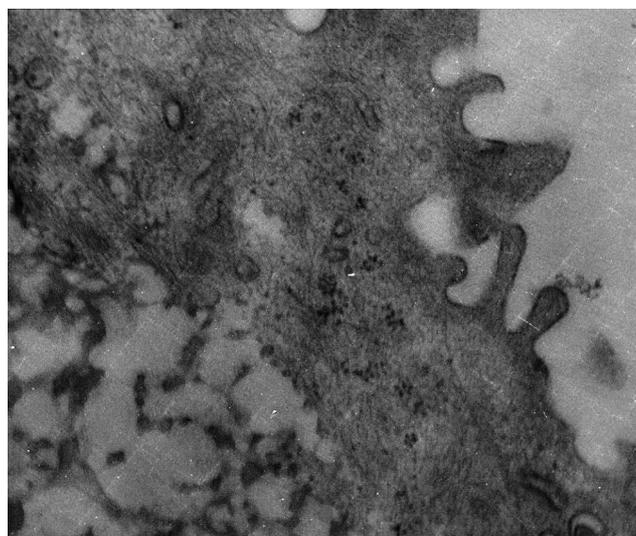


Рис. 5. Участки разрушения базальной мембраны, формирование цитоплазматических выростов

Ядра таких клеток были пикнотичны и обладали высокой электронной плотностью, создаваемой глыбками конденсированного. Базальная мембрана имела неравномерную толщину и среднюю электронную плотность. В структуре базальной мембраны выявлялись вакуолеподобные образования, не ограниченные мембраной. Кроме того, обнаруживались участки разрушения базальной мембраны, хроматина, расположенными вблизи ядерной мембраны (рис. 6).

В центральной области матрикса ядра находилась электронно-прозрачная субстанция с включениями единичных гранул деконденсированного хроматина. Ядерная мембрана была разрыхленной, со множественными очагами лизиса. В перинуклеарной области цитоплазмы

эндотелиоцитов располагались деструктивно измененные митохондрии. Наблюдался тотальный лизис крист и наружных мембран. Гранулярный эндоплазматический ретикулум был подвержен фрагментации. Рибосомы, как свободно лежащие в цитоплазме, так и связанные с мембранами гранулярного эндоплазматического ретикулума, практически отсутствовали. Редукция пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи сопровождалась разрыхлением и лизисом его мембран.

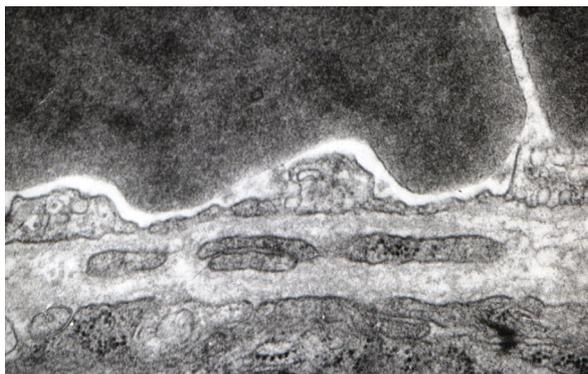


Рис. 6. Отек и гипертрофия эндотелиальных клеток, деструкция митохондрий, расширение и отек перикапиллярного пространства

Таким образом, при исследовании ультраструктуры сосудистой стенки обнаружены адаптивные и патологические изменения эндотелиальных клеток. Кадаптивно-компенсаторным процессам относились набухание и деструкция отдельных митохондрий, увеличение ядерной поверхности эндотелиоцитов. Патологические изменения эндотелиоцитов проявлялись отеком и гипертрофией эндотелиальных клеток, деструкцией митохондрий, расширением и отеком перикапиллярного пространства, что является морфологическим эквивалентом функциональных (обратимых) изменений окружающих тканей. Нарушения ультраструктуры кровеносных сосудов состоит в повреждении эндотелиальных клеток, отеке перикапиллярного пространства, разрыхлении и нарушении целостности базальной мембраны кровеносных капилляров. Эти изменения сопровождаются увеличением количества сладжированных тромбоцитов и эритроцитов с явлениями гемолиза, усилением проницаемости форменных элементов крови в перикапиллярное пространство, формированием микротромбов. Все это свидетельствует о значительном нарушении микрогемодинамики в тканях при реперфузии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, электронно-микроскопическими исследованиями показано, что к 7-м суткам развиваются изменения субмикроскопической архитектоники эндотелиальных клеток, в результате чего возникает эндотелиальная дисфункция. Ведущим звеном в развитии патологии сосудов на ультраструктурном уровне является митохондриальная недостаточность эндотелиоцитов, структурно проявляющаяся лизисом наружных мембран и крипт этих органелл, что влечет за собой дефицит био-

энергетического обеспечения внутриклеточных синтетических реакций и репаративных процессов. Нарушения ультраструктурной организации гладких миоцитов в области формирования тромбов свидетельствуют о невозможности поддерживать оптимальный тонус сосудов. Выбранная методика L-NAME индуцированной эндотелиальной патологии отличается высокой воспроизводимостью и адекватными результатами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киричук В. Ф., Глыбочко П. В., Пономарева А. И. Дисфункция эндотелия. — Саратов: Изд-во Саратовского мед. ун-та, 2008. — 129 с.
2. Калинин Р. Е., Сучков И. А., Жеребятеева С. Р., Пшенников А. С. Операции на сосудах. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. — 120 с.
3. Сучков, И. А. Профилактика рестеноза в реконструктивной хирургии магистральных артерий / И. А. Сучков, А. С. Пшенников, А. А. Герасимов А. Б. Агапов, А. А. Камаев // Наука молодых — Ereditio Juvenium. — 2013. — № 2. — С. 12—19.
4. Коробойникова Э. Н. Модификация определения продуктов ПОЛ в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. — 1989. — № 7. — С. 8—9.
5. Калинин, Р. Е. Варианты экспериментального моделирования венозной эндотелиальной дисфункции: современное состояние проблемы / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, А. С. Пшенников, А. Н. Новиков // Российский медико-биологический вестник им. акад. И. П. Павлова. — 2014. — № 3. — С. 143—147.
6. Калинин, Р. Е. Динамика некоторых биохимических показателей у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в различные сроки после реконструктивных операций / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, А. А. Никифоров, А. С. Пшенников // Российский медико-биологический вестник им. акад. И. П. Павлова, Рязань. — 2012. — № 1. — С. 41—44.
7. Особенности морфологической картины в зоне сосудистого анастомоза в различные сроки после реконструктивных операций на артериях нижних конечностей / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, М. В. Мнихович, Л. В. Кактурский, А. В. Левитин, С. А. Исаков // Морфологические ведомости. — 2013. — № 1. — С. 21—27.
8. Калинин, Р. Е. Эндотелиальная дисфункция и способы ее коррекции при облитерирующем атеросклерозе / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, А. С. Пшенников. — М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2014. — С. 151.
9. Napoli C., Ignarro L. J. Nitric oxide and atherosclerosis // Nitric Oxid. — 2001. — Vol. 5. — P. 88—97.
10. Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // Nature. — 1987. — Vol. 327. — P. 534—536.

Контактная информация

Мнихович Максим Валерьевич — к. м. н., доцент, ведущий научный сотрудник Центральной патологоанатомической лаборатории ФГБНУ НИИ морфологии человека, доцент кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии РНИМУ им. Н. И. Пирогова, г. Москва, сотрудник научного отдела ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: mnichmaxim@yandex.ru