

© С. В. Шорманов, С. В. Куликов, 2013
УДК 611.36:616.131-007.271-089:636.7

С. В. Шорманов и С. В. Куликов

ПЕРЕСТРОЙКА СТРУКТУРЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТЕНОЗЕ ЛЕГОЧНОГО СТВОЛА И ПОСЛЕ ЕГО ОПЕРАТИВНОЙ КОРРЕКЦИИ

Кафедра топографической анатомии и оперативной хирургии (зав. — академик РАМН проф. Ю. В. Новиков) и патологической анатомии (зав. — проф. К. И. Панченко), Ярославская государственная медицинская академия

Изменения печени изучены у 25 щенков с экспериментальным стенозом легочного ствола продолжительностью 6–12 мес, и 10 животных с устраненным пороком. Контрольную группу составили 10 собак соответствующего возраста. В работе использован комплекс гистологических, морфометрических, электронно-микроскопических и иммуногистохимических методик. При моделировании стеноза легочного ствола, в связи с вено-артериальной и вено-венозной реакциями возрастает сопротивление приносящих сосудов печени кровотоку. В интиме артерий формируются пучки гладких миоцитов (ГМ), мышечно-эластические сфинктеры, полиповидные подушки, а в ветвях воротной вены — пучки ГМ в интиме и клапаны. В выносящих венах гипертрофируются мышечные валики. Во всех сосудах наблюдается утолщение стенок, а в средней оболочке артерий появляются признаки склероза и возрастает экспрессия α -актина гладких миоцитов (α -SMA). В гепатоцитах выявляются ультраструктурные изменения в виде набухания матрикса митохондрий, частичной деструкции их крист, расширения канальцев эндоплазматической сети. После ликвидации порока выключаются ранее сформированные сосудистые адаптационные реакции, снижается тонус сосудов печени, что вызывает регресс гипертрофических изменений их средней оболочки. Число артериальных сосудов с мышечной тканью в интиме, сфинктерами и подушками уменьшается. Снижается экспрессия α -SMA в средней оболочке артерий. В венах оттока крови от печени мышечные валики истончаются. В гепатоцитах уменьшается выраженность дистрофических изменений, как на светооптическом, так и на ультраструктурном уровне.

Ключевые слова: печень, стеноз легочного ствола, иммуногистохимия, электронная микроскопия, обратимость

Продолжительность жизни пациентов со стенозом легочного ствола без оперативной коррекции не превышает 30 лет [2, 5]. Темпы развития недостаточности функционально перегруженного правого желудочка при данной врожденной патологии зависят не только от степени сужения легочного ствола, но и от состояния печени, активно участвующей в коррекции нарушенной гемодинамики [7, 8]. Однако даже своевременно выполненное хирургическое лечение не всегда приводит к положительному результату [1, 4]. Вероятно, это связано с невозможностью эффективного восстановления ранее измененных жизненно важных органов.

Цель настоящей работы — изучение перестройки структуры различных тканевых компонентов печени при создании в эксперименте стеноза легочного ствола и выявление возможной ее обратимости после устранения стеноза.

Материал и методы. Создание модели стеноза легочного ствола проведено на 35 беспородных щенках обоего пола в возрасте от 3 до 6 мес по ранее разработанной методике [7, 8]. Животных наблюдали от 6 до 12 мес, после чего 25 из них умерщвляли. В указанный временной интервал

морфологических изменений в печени выявлено не было. Это связано с тем, что к этому периоду наблюдения развивались и закреплялись компенсаторные реакции, а после 12 мес появлялись первые признаки декомпенсации. Поэтому у оставшихся 10 собак искусственно созданный порок устраняли именно через 6–12 мес, чтобы проследить за признаками обратного развития структурных изменений печени до того момента, когда они станут необратимыми. Выведение животных из эксперимента проводили кровопусканием из бедренной артерии под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и принципами, изложенными в Хельсинской декларации. В качестве контроля использовали материал от 10 собак соответствующего возраста. Из различных отделов печени вырезали кусочки и фиксировали в 10% нейтральном формалине или жидкости Карнуа. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином — эозином, по Массону, Харту, Браше и импрегнировали нитратом серебра по Футу. Для электронно-микроскопического исследования мелкие фрагменты печени фиксировали в 2% глутаральдегиде на фосфатном буфере и заливали в смесь эпона и аралдита. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных антител к α -SMA (α -актину гладких миоцитов — ГМ), ферментных авидино-биотиновых систем детекции и хромогенных субстратов (DAB и Nikel-DAB) (Novocastra, Великобритания) [3]. С помощью винтового окулярного микрометра типа

Сведения об авторах:

Шорманов Сергей Венедиктович (e-mail: S_V_Shormanov@rambler.ru), Куликов Сергей Владимирович, кафедра топографической анатомии с оперативной хирургией, кафедра патологической анатомии, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, Ярославль, ул. Революционная, 5

МОВ-1-15^x у всех попавших в поперечный срез сосудов измеряли наружный диаметр без учета адвентиции и толщину средней оболочки. Для определения уровня ветвления сосудов использовали ранее разработанную методику комплексного изучения сосудов печени [7, 8]. В соответствии с этим все артерии были условно разделены на 4 группы: крупные (диаметром 125 мкм и более), средние (124–51 мкм), мелкие (50–21 мкм) и артериолы (20 мкм и менее). Сосуды с диаметром от 50 до 21 мкм мы не относили к артериолам потому, что, как правило, они находились на территории порталных трактов, имели довольно толстую стенку и не были похожи на сосуды микроциркуляции. Внутриорганные ветви воротной вены в зависимости от калибра сопровождаемых ими артерий также разделяли на вены уровня крупных артерий — 190 мкм и более, средних артерий — 189–110 мкм, мелких артерий — 109–51 мкм и артериол — 50 мкм и менее. На 4 группы (крупные, средние, мелкие, вены) были разделены и печеночные вены: за основу был принят диаметр соответствующих воротных вен.

В русле оттока крови от печени, на уровне крупных печеночных вен, имеющих у собак мышечные валики, измеряли толщину последних. Цифровой материал обрабатывали с помощью программы STATISTICA (версия 6) с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферони для множественных сравнений. Полученные данные считали значимыми, если ошибка не превышала 5% ($P < 0,05$).

Результаты исследования. У животных со стенозом легочного ствола оказалось, что по сравнению с контролем стенка ветвей печеночной артерии значительно утолщалась, а просвет сужался. При этом их внутренняя эластическая мембрана становилась более гофрированной, а эндотелиоциты приобретали частоколоподобный вид. Перечисленные признаки отражают повышение тонуса сосудов. В средней оболочке артерий выявлялись гипертрофия ГМ и склеротические изменения, о чем свидетельствовало не только разрастание соединительной ткани, но и повышение экспрессии α -SMA (рис. 1, а, б).

Одновременно в артериальных сосудах печени у собак этой серии опытов чаще, чем в контроле, встречались особые гладкомышечные образования в виде скоплений мышечной ткани в интиме, мышечно-эластических сфинктеров и полиповидных подушек. Мышечная ткань в интиме состояла из косо- и продольно ориентированных ГМ, расположенных либо в виде пучков (так называемые подушки Эбнера) (см. рис. 1, в), либо циркулярно, по всему периметру сосуда (артерии замыкающего типа). Мышечно-эластические сфинктеры локализовались в устьях боковых ветвей и на продольном срезе имели вид одного или двух лепестков (см. рис. 1, г). В области расположения данных образований эластическая мембрана сосуда расщеплялась на 2 листка, между которыми находились ГМ, оплетенные эластическими и ретикулярными волокнами. Полиповидные подушки встречались в артериях крупного, а

также среднего калибра и имели округлую или эллипсоидную форму и ножку, соединяющую их со стенкой сосуда. Мы выделили 3 типа этих образований. Подушки первого типа представляли собой выпячивание интимы в просвет артерии (см. рис. 1, д). Подушки второго типа состояли из указанного инвагината, содержащего пучки ГМ, связанные через ножку со средней оболочкой сосуда (рис. 1, е). Они пересекали друг друга в различных направлениях и были оплетены эластическими и ретикулярными волокнами. Периферическая часть подушек третьего типа была построена из элементов интимы и ГМ средней оболочки, а центральная — из клеточных и волокнистых структур соединительной ткани, инвагината адвентиции. В ветвях воротной вены, так же как и в ветвях печеночной артерии, наблюдалось утолщение средней оболочки с гипертрофией ГМ и увеличением количества эластических волокон. В области разветвлений данных сосудов мы обнаруживали клапаны, представлявшие собой тонкие выпячивания интимы с ГМ в основании. Синусоиды долек имели обычный просвет и не отличались по структуре от таковых у контрольных животных. В сосудах русла оттока крови от печени, т. е. в печеночных венах, наблюдалась не только гипертрофия мышечной ткани средней оболочки как в приносящих сосудах (печеночные артерии и ветви воротной вены), но и утолщение имеющихся здесь у собак мышечных валиков. Расстройства кровообращения в печени в условиях стеноза легочного ствола и изменения ее сосудов отражались и на состоянии других тканевых компонентов этого органа. Так, в цитоплазме гепатоцитов выявлялись вакуоли и мелкие белковые зерна.

При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено набухание матрикса митохондрий, частичная деструкция их крист и расширение канальцев эндоплазматической сети (рис. 2, а, б), количество зерен гликогена снижалось. Перипортальные поля расширялись за счет разрастания соединительной ткани.

Морфометрия позволила установить, что толщина средней оболочки крупных артерий увеличивалась в 1,7 раза, средних и мелких артерий — в 1,2 раза, а артериол — в 1,1 раза. Толщина стенки ветвей воротной вены, сопровождающих крупные артерии, возрастала в 2,3 раза, средних артерий — в 1,4 раза, а мелких артерий — в 1,2 раза; в венах, расположенных на уровне артериол, стенки утолщались в 1,5 раза (таблица). В печеночных венах, выносящих кровь из печени, происходили более значимые изменения. Так, толщина средней оболочки крупных вен увеличивалась в 5 раз,

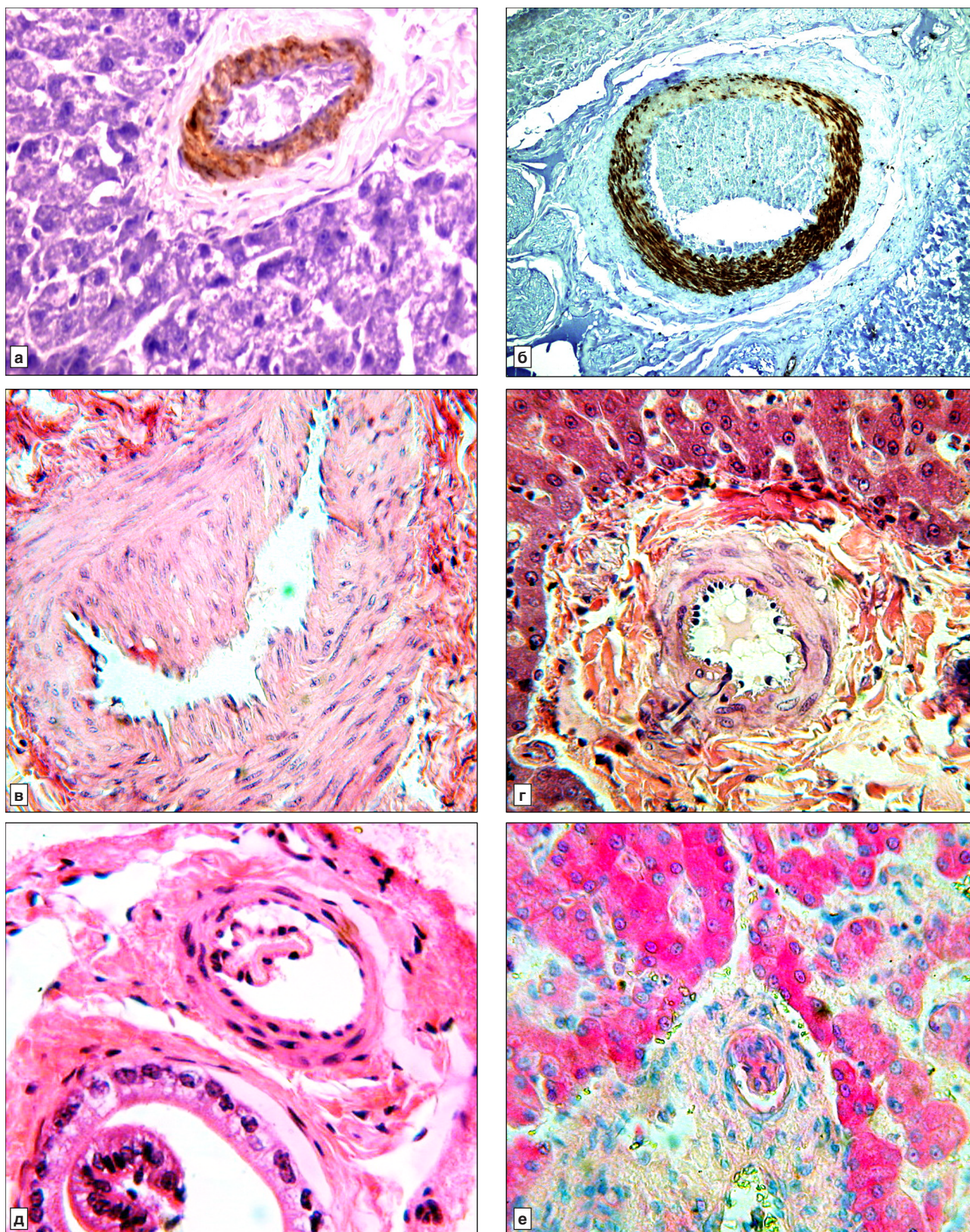
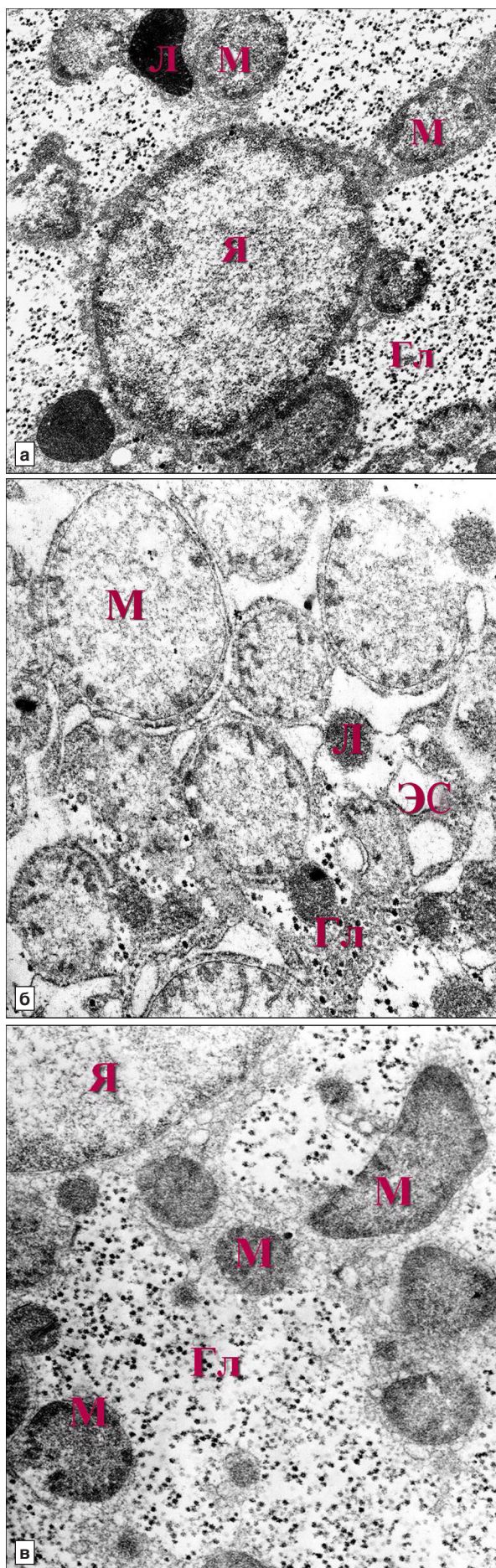


Рис. 1. Структурные и иммуногистохимические изменения сосудов печени собаки в контроле (а) и при компенсированном стенозе легочного ствола (б–е).

а — нормальная экспрессия α -актина гладких миоцитов (α -SMA) в мелкой артерии; б — высокая экспрессия β -SMA в крупной артерии; в — пучок гладких миоцитов в интима средней артерии; г — сфинктер второго типа в устье мелкой артерии; д — подушка первого типа в средней артерии; е — подушка второго типа с высоким содержанием РНК в средней артерии; а, б — реакция с моноклональными телами на α -SMA; в–д — окраска гематоксилином – эозином; е — окраска по Браше. а, в, д — об. 20, ок. 10; б, г — об. 10, ок. 10; е — об. 3,7, ок. 10



средних — в 2,1 раза, мелких — в 1,6 раза, а в венах — в 1,7 раза. Средняя толщина мышечных валиков крупных печеночных вен возрастала в 1,5 раза ($P < 0,001$).

Устранение стеноза легочного ствола приводило к снижению тонуса ветвей печеночных артерий, что сопровождалось расширением просвета и истончением стенки большинства этих сосудов. О нормализации тонуса свидетельствовало и уменьшение складчатости их внутренней эластической мембраны. Артерии с признаками гипертрофии гладкой мышечной ткани и склероза средней оболочки обнаруживались значительно реже, чем до корригирующей операции. При этом снижалась и экспрессия α -SMA в их стенках. Кроме перечисленного, в кровеносном русле печени происходило уменьшение числа сосудов, обладающих мышечной тканью в интимае, мышечно-эластическими сфинктерами, полиповидными подушками и клапанными структурами. Стенки ветвей воротной и печеночных вен, а также синусоиды мало отличались от таковых в контроле. Мышечные валики печеночных вен истончались. В цитоплазме некоторых гепатоцитов определялись мелкие белковые зерна, в то же время вакуоли не обнаруживались. Изменения ультраструктуры печени характеризовались признаками обратимости ранее возникших деструктивных изменений в органеллах. В частности, митохондриальный матрикс был электронно-плотным, а каналы эндоплазматической сети суживались и приобретали обычный вид (см. рис. 2, б, в). В цитоплазме гепатоцитов наблюдалось увеличение численности зерен гликогена. Площади перипортальных полей уменьшались, а признаки их склероза становились менее выраженными.

Морфометрия показала, что после устранения стеноза легочного ствола средняя оболочка крупных артерий становилась тоньше в 1,9 раза, средних — в 1,3 раза, мелких — в 1,2 раза, а артериол — в 1,1 раза. В значительной мере менялась и толщина средней оболочки ветвей воротной вены. В частности, в венах на уровне

Рис. 2. Ультраструктура печени собаки в контроле (а), при компенсированном стенозе легочного ствола (б) и после его устранения (в).

а — высокое содержание зерен гликогена в цитоплазме гепатоцита; митохондрии с электронно-плотным матриксом; б — уменьшенное количество зерен гликогена; митохондрии с набухшим матриксом и частично разрушенными кристами; расширенные каналы эндоплазматической сети; в — митохондрии с электронно-плотным матриксом; увеличенное количество зерен гликогена в цитоплазме. Гл — гликоген; М — митохондрии; Я — ядро гепатоцита; Л — лизосомы; ЭС — эндоплазматическая сеть. Ув.: а — 18 000; б — 24 000; в — 30 000

Толщина средней оболочки сосудов печени у собак контрольной и экспериментальных группы ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм)

Объект исследования	Контроль	Экспериментальные группы	
		Стеноз легочного ствола (СЛС)	После устранения СЛС
Русло притока крови к печени:			
артерии:			
крупные	24,0±1,1	42,7±2,8*	22,0±1,3 [#]
средние	13,2±0,8	16,0±0,8*	12,7±0,5 [#]
мелкие	6,52±0,10	8,12±0,25*	6,52±0,21 [#]
артериолы	3,75±0,09	3,90±0,10**	3,52±0,20
воротная вена уровня:			
крупных артерий	6,05±0,20	13,9±1,2*	8,0±1,3 ^{*,#}
средних артерий	5,1±0,3	6,9±0,4*	5,0±0,4 [#]
мелких артерий	4,42±0,21	5,01±0,22*	3,20±0,10 ^{*,#}
артериол	2,83±0,11	4,20±0,20**	2,91±0,10 [#]
Русло оттока крови от печени:			
печеночные вены:			
крупные	6,2±0,3	31±4*	5,4±0,6 [#]
средние	4,46±0,10	9,5±1,1*	4,11±0,20 [#]
мелкие	3,20±0,10	5,3±0,3*	3,10±0,10 [#]
венулы	2,70±0,10	4,7±0,3*	2,80±0,10 [#]

* Различия значимы по сравнению с контролем при $P < 0,001$; ** при $P < 0,05$.# Различия значимы по сравнению со стенозом при $P < 0,001$.

крупных артерий она уменьшалась в 1,7 раза, на уровне средних артерий и артериол — в 1,4 раза, а в венах на уровне мелких артерий — в 1,6 раза. Подобные изменения касались и толщины стенок печеночных вен. Так, средняя оболочка в их крупных ветвях истончалась в 5 раз, в средних — в 2,3 раза, а в мелких венах и венулах — в 1,6 раза. Средняя толщина мышечных валиков печеночных вен уменьшалась в 1,6 раза ($P < 0,001$).

Обсуждение полученных данных. Создание в эксперименте стеноза легочного ствола в связи с гемодинамической перегрузкой правого желудочка приводит к нарушению оттока крови от печени с расширением ветвей печеночных вен. Мышечные валики этих сосудов, в норме играющие у собак важную роль в депонировании крови, подвергаются значительной гипертрофии. В условиях перегрузки кровью печеночных вен включается еще один механизм адаптации: вено-артериальная реакция [6–8]. Сущность ее сводится к рефлекторному сокращению гладкой мускулатуры печеночных артерий, повышению их тонуса и гипертрофии сосудистых стенок. При этом сопротивление артерий кровотоку возрастает [6, 7], что способствует ослаблению притока крови в синусоиды и препятствует нарушению трансапиллярного обмена и тканевого гомеостаза. Гипертрофическим изменениям подвергаются и стенки воротных вен с повышением их тонуса,

что квалифицируется нами как вено-венозная реакция [7]. Следовательно, в приносящих сосудах (печеночные артерии и ветви воротной вены) нарастает сопротивление кровотоку, а в выносящих — создаются возможности для ограничения возврата венозной крови в большой круг кровообращения. Наши исследования показали, что, кроме перечисленных выше адаптационных реакций, включаются еще ряд компенсаторных механизмов в виде появления специализированных регуляторных структур, к которым относятся косопродольные пучки ГМ в интимае, мышечно-эластические сфинктеры и полиповидные подушки артерий, а также клапаны ветвей воротной вены. Источником их развития являются ГМ средней оболочки. Миграционная активность последних обусловлена гемодинамическим повреждением эндотелия, адгезией и агрегацией тромбоцитов с последующим высвобождением тромбоцитарного фактора роста, который стимулирует пролиферацию ГМ, утрату ими клеточных связей и переход из средней оболочки в интиму [9–11]. С помощью данных контрактильных структур регулируется движение крови по артериальной системе печени в зависимости от потребности в ней различных структурно-функциональных единиц этого органа, т. е. при наличии нарушенного гемодинамического режима создаются возможности для оптимальной циркуляции крови и

адекватного тканевого обмена [7, 8]. Несмотря на участие в компенсации сразу нескольких механизмов, с течением времени в печени в связи с затруднением венозного оттока нарастает хроническая гипоксия, способствующая разрастанию волокон в строме органа и стенке сосудов. Разрастание соединительной ткани в последних вызвано активностью миофибробластов, синтезирующих ее компоненты и экспрессирующих α -SMA [3]

Устранение экспериментального стеноза легочного ствола сопровождается улучшением оттока крови от печени с уменьшением функциональной нагрузки на печеночные вены. При этом, с одной стороны, происходит истончение ранее гипертрофированных стенок данных сосудов с уменьшением степени развития их мышечных валиков, а с другой — выключаются вено-артериальная и вено-венозная реакции. Последнее влечет за собой снижение тонуса артерий с падением мощности гладкой мускулатуры их средней оболочки, а также уменьшение уровня развития таких адаптационных структур, как пучки мышечной ткани в интимае, мышечно-эластические сфинктеры, полиповидные подушки и клапаны, которые утрачивают свое значение регуляторов местной гемодинамики. Одновременно истончаются стенки интрамуральных ветвей воротных вен. Степень сосудистого склероза уменьшается, что подтверждается и низкой экспрессией α -SMA. Таким образом, ликвидация длительно существующего стеноза легочного ствола инициирует процесс обратного развития морфологических изменений сосудистого русла печени с последующим восстановлением и других тканевых структур этого органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алекаян Б. Г., Подзолков В. П. и Зуфаров М. М. Ближайшие и отдаленные результаты баллонной вальвулопластики стеноза легочной артерии при его сочетании с гипоплазией правого желудочка. Грудная и серд.-сосуд. хир., 1998, № 6, с. 10–15.
2. Белоконов Н. А. и Подзолков В. П. Врожденные пороки сердца. М., Медицина, 1991.
3. Киясов А. П., Одинцова А. Х., Гумерова А. А. и др. Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2008, т. 3, № 1, с. 70–75.
4. Плеханова О. С., Соломатина М. А., Меньшикова М. Ю. и др. Активаторы плазминогена и матриксной металлопротеиназы в экспериментальном ремоделировании артерий. Кардиология, 2006, т. 46, № 9, с. 47–56.
5. Шарыкин А. С. Врожденные пороки сердца. М., Медицина, 2005.
6. Шорманов И. С. Сосудистая система почек при стенозе легочного ствола с различным уровнем компенсации гемодинамики. Бюл. exper. биол., 2004, т. 137, № 3, с. 332–375.
7. Шорманов С. В. и Куликов С. В. Изменения кровеносных сосудов печени при стенозе легочного ствола в стадии компенсации и декомпенсации. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 51–55.
8. Шорманов С. В. и Куликов С. В. Особенности компенсаторных реакций сосудов печени при экспериментальной коарктации аорты. Бюл. exper. биол., 2009, т. 147, № 1, с. 113–117.
9. Mehta J. and Gainesville F. Role of platelet antagonists in coronary artery disease. Amer. Heart. J., 1984, v. 107, № 4, p. 859–869.
10. Ross R. and Vogel A. The platelet-derived growth factor. Arch. Pathol., 1978, v. 14, № 2, p. 203–210.
11. Wissler R. W. Neuste Studien über die Pathogenese und Rückbildung der Atherosclerose. Therapiewoche, 1982, Bd. 32, № 3, S. 3735–3739.

Поступила в редакцию 30.10.2012

Получена после доработки 13.03.2013

HEPATIC STRUCTURE REMODELING AFTER AN EXPERIMENTAL PULMONARY TRUNK STENOSIS AND FOLLOWING ITS OPERATIVE CORRECTION

S. V. Shormanov and S. V. Kulikov

Changes in the liver were studied in 25 puppies with experimental pulmonary trunk stenosis of 6–12 months duration and 10 animals after the elimination of this defect. Control group included 10 dogs of the corresponding age. A complex of histological, morphometric, electron microscopic and immunohistochemical methods was used. During the modeling of pulmonary trunk stenosis, the resistance of hepatic afferent vessels to hepatic blood flow was increased due to the venous-arterial and venous-venous reactions. In the arteries, the bundles of smooth myocytes (SM) of the intimal muscle were formed together with the musculo-elastic sphincters, polypoid cushions, while in the branches of the portal vein, the intimal SM bundles and the valves appeared. In the efferent veins, the muscular elevations were hypertrophied. In all the vessels the thickening of the walls was observed, and in the media of the arteries, there were signs of sclerosis and the increased expression of α -smooth muscle actin (α -SMA). Hepatocytes demonstrated marked ultrastructural changes: mitochondrial matrix swelling, partial destructions of their cristae, dilation of endoplasmic reticulum cisterns. After the elimination of the defect, previously formed vascular adaptation reactions were found to disappear, the tone of the blood vessels in the liver decreased, causing the regression of hypertrophic changes of their media.

The number of the arterial blood vessels with intimal muscle, sphincters and cushions decreased. The expression of α -SMA in the media of the arteries was also reduced. In hepatic efferent veins, the muscular elevations became attenuated. The dystrophic changes in hepatocytes regressed at both light-microscopic and the ultrastructural level.

Key words: *liver, pulmonary trunk stenosis, immunohistochemistry, electron microscopy, reversibility*

Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery and Department of Pathological Anatomy, Yaroslavl' State Medical Academy