

УДК 611.018.74:616.12-007-053.1-089

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЭНДОТЕЛИЯ КРОНАРНЫХ МИКРОСОСУДОВ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА СЕРДЦА У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ И В ВОЗРАСТЕ ОДНОГО–ТРЕХ ЛЕТ

Г.М. Казанская, Е.В. Углова, В.Н. Ломиворотов, А.М. Волков, А.В. Шунькин, А.М. Караськов

Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина

cpsc@nriр.ru

Ключевые слова: эндотелий, микрососуды, миокард, ультраструктура, ишемия, реперфузия сердца, врожденный порок сердца.

Клиническая картина врожденного порока сердца (ВПС) характеризуется тяжестью общего состояния ребенка и, как правило, обратно пропорциональна возрасту [4]. Уже с первых дней жизни при электрокардиографическом исследовании у больных детей выявляются нарушения ритма, глубокие изменения миокарда желудочков и признаки перегрузки того отдела сердца, который несет на себе основную нагрузку по компенсации порока [2]. По мере роста и развития ребенка с ВПС нарушение системной гемодинамики приводит к развитию декомпенсации сердечно-сосудистой системы и истощению адаптационных механизмов. Показано, что при тетраде Фалло гипертрофические изменения миокарда могут развиваться до достижения пациентом трехлетнего возраста [8]. В свою очередь у больных старше четырех лет наблюдают послеоперационную функциональную несостоятельность сердца [23]. В связи с этим в настоящее время утвердилось представление о необходимости более раннего выполнения хирургической коррекции ВПС. Вместе с тем, морфологические особенности оперированного миокарда больных ВПС раннего возраста изучены недостаточно. Имеются лишь единичные описания ультраструктурных изменений кардиомиоцитов у больных ВПС первых лет жизни [6, 20]. Целью настоящего исследования явился ультраструктурный анализ интраоперационной динамики различных морфологических типов эндотелиальных клеток (ЭК) микрососудов (МС) правого предсердия (ПП) у детей первого года жизни и у пациентов в возрасте одного–трех лет на этапах хирургического лечения ВПС в условиях искусственного кровообращения (ИК) и защиты миокарда кардиopleгическим раствором «Кустодиол».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Электронно-микроскопический анализ проводили в диагностических биоптатах ПП 19 пациентов, оперированных по поводу ВПС в условиях ИК в режиме умеренной гипотермии и защиты миокарда раствором «Кустодиол». Все пациенты были разделены на две группы: в первой средний возраст больных составлял $8,8 \pm 0,7$ мес. ($n=9$), а во второй – $1,8 \pm 0,2$ лет ($n=10$).

Биоптаты получали: I – до коррекции порока, после индукции ИК непосредственно перед окклюзией аорты при температуре в прямой кишке $33,33 \pm 0,55$ и $33,45 \pm 0,25$ °C в группах 1 и 2 соответственно; II – в конце периода окклюзии аорты, длившегося $44,11 \pm 6,01$ и $58,10 \pm 5,34$ мин соответственно ($P>0,05$); III – после восстановления кровотока в коронарном русле при температуре $36,76 \pm 0,13$ и $36,54 \pm 0,19$ °C через $26,3 \pm 3,5$ и $29,4 \pm 5,6$ мин реперфузионного периода в группах 1 и 2 соответственно.

После иссечения все биоптаты немедленно ополаскивали в фосфатном буферном растворе ($pH=7,35$) и помещали в фиксирующий раствор ($18-20$ °C), содержащий 2% параформа и 2,5% глутарового альдегида. Через 1 сутки 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% раствором OsO_4 на фосфатном буферном растворе ($pH=7,35$) и подвергали дегидратации в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Заливку проводили в смесь эпоксидных смол (Epon 812, Epon DDSA и Araldite M). Ориентированные ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме фирмы «Reichert» (Австрия) и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Все полученные срезы анализировали в электронном микроскопе JEM 100CX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 Квт в диапазоне увеличений от 5 000 до 26 000.

Оценку интраоперационных изменений эндотелия, выстилающего внутреннюю поверхность МС ПП, проводили по методике, разработанной ранее [12]. На трех этапах операции подсчитывали количество профилей ЭК, попавших в срез при начальном увеличении в 10 000 раз. В общей клеточной популяции, руководствуясь различиями в электронной плотности цитоплазмы и степени развития микровезикулярного аппарата, выделяли пять морфологических разновидностей ЭК (основного типа, светлые, темные, отечные и гипертрофированные). Затем определяли долю каждой из пяти морфологических разновидностей ЭК, представляя в процентах к общему количеству клеток эндотелия, учтенных на срезе.

Результаты представляли в виде среднего значения и ошибки среднего значения. Достоверность по-

лученных данных проверяли с помощью параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Уилкоксона, Манна-Уитни. Для оценки достоверности корреляционных связей использовали коэффициент корреляции Спирмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ

До окклюзии аорты эндотелиальная выстилка МС в группах 1 и 2 представлена пятью морфологическими разновидностями ЭК, включающими клетки основного типа, светлые, темные, отечные и гиперосмированные. При этом до ишемии миокарда в эндотелии капилляров обеих групп пациентов преимущественно выявляются клетки основного типа ($45,04 \pm 3,09$ и $53,32 \pm 3,60\%$) и темные ($36,58 \pm 6,16$ и $31,49 \pm 4,98\%$). Доля светлых ЭК ниже и составляет в проанализированных группах $16,05 \pm 4,00$ и $13,14 \pm 2,67\%$ соответственно, тогда как число отечных и гиперосмированных клеток в обеих группах носит следовой характер (таблица).

У детей первого года жизни (группа 1) клетки основного типа, светлые и темные, которые принято относить к «рабочим» разновидностям ЭК, существенно различаясь по электронной плотности цитоплазмы, имеют хорошо дифференцирующиеся структурно-функциональные зоны. При этом в периферических районах некоторых «рабочих» ЭК регистрируются фенестры. Вместе с тем, в эндотелии «одношовных» капилляров, изредка наблюдаемых в миокарде детей до года, вне зависимости от электронной плотности цитоплазмы различия в толщине зоны органелл и периферической отсутствуют. Ядра в трех морфологи-

ческих разновидностях ЭК содержат небольшое либо умеренное количество конденсированного хроматина, расположенного вблизи ядерной оболочки, в составе которой регистрируются поровые комплексы. Ядрышки имеют в основном классическое строение. В их составе дифференцируется диффузный фибриллярный компонент, расположенный центрально, и граничащий с ним плотный фибриллярный и гранулярный компоненты. Митохондрии варьируют по размерам и электронной плотности матрикса. Часть из них содержит умеренно электронно-плотный матрикс, иногда с мелкими локусами просветления, тогда как другие выглядят электронно-прозрачными и сохраняют лишь мелкие фрагменты крист. Вокруг митохондрий изредка группируются каналцы гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР) с крупными рибосомами на мембранах (рис. 1, а). Аппарат Гольджи (АГ) гиперплазирован и состоит из нескольких комплексов, образованных цистернами, различающимися по размерам. Вокруг цистерн располагаются многочисленные вакуоли и пузырьки, а также специфические эндотелиальные гранулы с разной плотностью матрикса.

У детей первого года жизни состояние микроциркулярного аппарата позволяет условно выделить в составе каждой из «рабочих» разновидностей ЭК три подгруппы. В первой, на фоне гипертрофии органелл, принимающих участие в процессах внутриклеточного синтеза, снижение электронной плотности цитоплазмы при переходе от темных ЭК к клеткам основного и светлого типов сопровождается уменьшением популяции свободных и прикрепленных транспортных везикул. Во второй подгруппе «рабочие» ЭК, отличающаяся по электронной плотности цитоплазмы, имеют

Изменения ультраструктуры микрососудов правого предсердия у детей первого года жизни (группа 1) и у пациентов в возрасте одного–трех лет (группа 2) на этапах хирургической коррекции ВПС в условиях искусственного кровообращения и защиты миокарда раствором «Кустодиол»

Группы	Эндотелиальные клетки (доля от общего числа на срезе, %)				
	основной тип	светлые	темные	отечные	гиперосмированные
До окклюзии аорты					
Группа 1, n=9 ($T_R = 33,33 \pm 0,55$ °C)	$45,04 \pm 3,09$	$16,05 \pm 4,00$	$36,58 \pm 6,16$	$1,15 \pm 0,40$	$1,18 \pm 0,57$
Группа 2, n=7 ($T_R = 33,45 \pm 0,25$ °C)	$53,32 \pm 3,60$	$13,14 \pm 2,67$	$31,49 \pm 4,98$	$1,44 \pm 0,67$	$0,61 \pm 0,23$
Конец окклюзии аорты					
Группа 1, n=9 ($44,11 \pm 6,01$ мин)	$29,94 \pm 3,61^*$	$29,19 \pm 5,14$	$25,60 \pm 5,27$	$13,32 \pm 3,92^*$	$1,95 \pm 0,57$
Группа 2, n=10 ($58,10 \pm 5,34$ мин)	$32,65 \pm 4,11^*$	$22,38 \pm 4,24$	$28,92 \pm 6,02$	$10,07 \pm 2,78^*$	$5,98 \pm 2,94$
Этап реперфузии					
Группа 1, n=8 ($T_R = 36,76 \pm 0,13$ °C)	$34,48 \pm 4,38$	$23,26 \pm 3,79$	$26,44 \pm 6,21$	$14,47 \pm 5,97^*$	$1,35 \pm 0,48$
Группа 2, n=10 ($T_R = 36,54 \pm 0,19$ °C)	$40,33 \pm 2,84^*$	$25,06 \pm 2,58^*$	$27,77 \pm 3,23$	$4,56 \pm 0,92^*$	$2,28 \pm 0,91$

* $P < 0,05$ разница достоверна с доокклюзионным этапом операции; T_R – температура в прямой кишке

одинаковую степень гипертрофии органелл, принимающих участие в процессах внутриклеточного синтеза и трансэндотелиальном переносе макромолекул. Третью подгруппу в миокарде детей до года составляют ЭК «одношовных» капилляров, которые вне зависимости от электронной плотности цитоплазмы содержат ядра с равномерно зернистой кариоплазмой, гипертрофированный ГЭР и АГ, окруженный многочисленными пузырьками и гранулами, тогда как число транспортных везикул в них минимально.

У пациентов группы 2 клетки «рабочих» разновидностей также имеют разнообразную морфологию, но в отличие от детей первого года жизни полиморфизм, выявляемый внутри каждой из разновидностей, главным образом затрагивает общую архитектуру ЭК и состояние органелл, принимающих участие в процессах внутриклеточного синтеза. По степени развития спецификаций, обеспечивающих трансэндотелиальный перенос макромолекул, «рабочие» разновидности ЭК у детей в возрасте от одного года до трех лет не имеют принципиальных отличий от дифинитивного эндотелия коронарных МС.

Контуры большинства ЭК основного типа и светлых не отличаются от нормы. В их цитоплазме крупные ядра окружены равномерной по ширине, умеренно извилистой кариолеммой. При этом в одних ядрах глыбки плотного неактивного хроматина располагаются преимущественно вдоль ядерной оболочки, а зернистость остальной кариоплазмы выглядит равномерной. В других ядрах гетерохроматина больше, а эухроматин выглядит разреженным, особенно в светлых ЭК. Ядрышки, как правило, имеют неравномерно плотный матрикс и четкие контуры. Митохондрии демонстрируют матрикс умеренной электронной плотности, в составе которого иногда выявляются локусы просветления (рис. 1, б). В светлых ЭК изредка регистрируются митохондрии с прозрачным матриксом, частично или полностью лишенные крист. Размеры АГ невелики, но в отдельных клетках встречаются крупные комплексы, цистерны которых покрыты многочисленными пузырьками, в том числе и со щетинками. ГЭР представлен разветвленной сетью каналов с неравномерно распределенными прикрепленными рибосомами. В светлых ЭК некоторые каналы ГЭР выглядят слегка расширенными. В большинстве ЭК основного типа транспортные везикулы равномерно заполняют пространство свободной цитоплазмы и с равными интервалами следуют друг за другом в составе базальной (реже люминальной) плазмалеммы. В светлых ЭК часто отмечается чередование визуально «пустых» участков цитоплазмы и локусов, плотно заполненных везикулами.

Темные ЭК в группе 2 формируют гетерогенную популяцию, в которой вычлениваются две разновидности. Клетки первой общей архитектурой сходны с ЭК основного типа, но имеют более высокую электронную плотность цитоплазмы и разветвленную сеть каналов ГЭР, покрытых равномерно распределенными

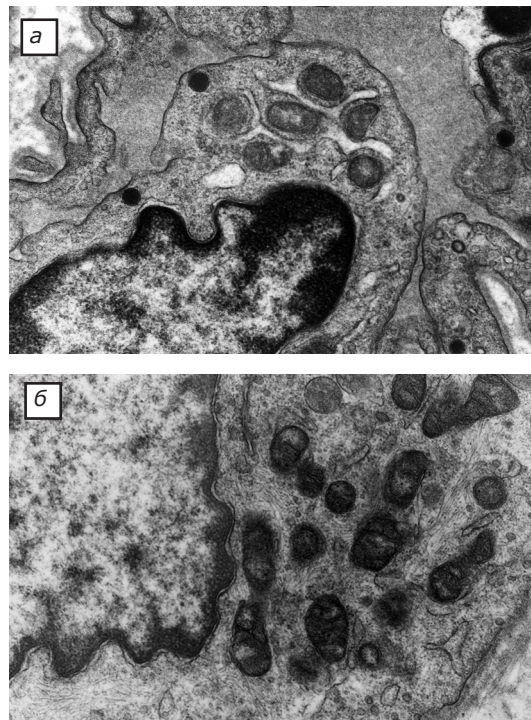


Рис. 1. Ультраструктура микроциркуляторного русла миокарда ПП на доокклюзионном этапе хирургической коррекции ВПС в условиях ИК в режиме умеренной гипотермии и защиты миокарда раствором «Кустодиол»: а – разветвленная сеть каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума, покрытых рибосомами, окружает группу митохондрий в цитоплазме эндотелиальной клетки основного типа у пациента в возрасте 9 мес., ув. $\times 20.000$; б – скопление митохондрий с равномерным и локально просветленным матриксом в околоядерном пространстве ЭК основного типа у пациента в возрасте 19 мес., ув. $\times 16.600$.

ми прикрепленными рибосомами. Темные клетки второй разновидности выглядят более узкими, им свойственна извилистость не только люминального, но и базального контура. В составе ядерной оболочки регистрируются локусы расширения межмембранного пространства. Кариоплазма заметно уплотнена. Ядрышки не обнаруживаются. В цитоплазме часто встречаются крупные митохондрии с локально или полностью отечным матриксом, практически лишенные крист. АГ не зафиксирован. Сеть каналов ГЭР выглядит менее разветвленной, чем в темных ЭК первой разновидности. Вместе с тем, количество рибосом и полисом, свободно расположенных в цитоплазме, не отличается в клетках двух разновидностей и значительно выше, чем в ЭК основного типа. Количество транспортных везикул варьирует. В одних ЭК везикул много и они равномерно распределяются в цитоплазме и на плазмалемме, в других клетках признаки активного микропиноцитоза отсутствуют, причем в цитоплазме обнаруживаются участки, обедненные транспортными спецификациями с резким просветлением цитоплазмы.

Отечные ЭК характеризуются широкими профилями, низкой электронной плотностью цитоплазмы, отсутствием органелл, принадлежащих к белоксинте-

ческому и энергетическому аппарату. Гиперосмированные клетки обладают гомогенизированной цитоплазмой, в которой дифференцировка отдельных клеточных органелл, как правило, невозможна.

В конце длительной тотальной ишемии миокарда у пациентов обеих групп в эндотелии коронарных МС регистрируется достоверное ($P < 0,05$) снижение числа ЭК основного типа (до $29,94 \pm 3,61$ и $32,65 \pm 4,11\%$ соответственно). На этом фоне статистически значимо возрастает доля отечных ЭК (до $13,32 \pm 3,92$ и $10,07 \pm 2,78\%$). Число темных и гиперосмированных ЭК, напротив, изменяется недостоверно по сравнению с доокклюзионным этапом операции и составляет в первой группе пациентов $25,60 \pm 5,27$ и $1,95 \pm 0,57\%$, а во второй – $28,92 \pm 6,02$ и $5,98 \pm 2,94\%$ соответственно (таблица). Динамика светлых ЭК различается в двух группах детей. У пациентов первого года жизни регистрируется достоверное ($P < 0,05$) увеличение доли этих клеток в эндотелии коронарных МС до $29,19 \pm 5,14\%$ относительно доокклюзионного этапа операции, а у детей в возрасте одного–трех лет выявляемое повышение их численности является статистически незначимым ($22,38 \pm 4,24\%$, $P > 0,05$) (таблица).

В обеих группах детей субклеточная организация ЭК основного типа, светлых и темных варьирует, но в целом в каждой из трех «рабочих» разновидностей ЭК выделяются две подгруппы. К первой относятся ЭК с тонкой структурой, сходной с таковой в начале операции, либо имеющей минимальные отличия. Ко второй подгруппе относятся клетки «рабочих» разновидностей с более выраженной перестройкой морфологии. В популяции ЭК основного типа такие клетки отличаются отсутствием четкой дифференцировки на структурно-функциональные зоны. Ядерная оболочка не во всех ядрах сохраняет четкость на всем своем протяжении, а межмембранное пространство нередко неравномерно расширено. Кариоплазма содержит сравнительно много глыбок гетерохроматина, а пространство между ними выглядит рыхлым или хлопьевидным. Количество митохондрий с частично просветленным и электронно-прозрачным матриксом увеличено. В составе АГ выявляются 2–3 короткие, расширенные цистерны, окруженные немногочисленными вакуолями и мелкими пузырьками. ГЭР представлен единичными каналами, покрытыми отдельными рибосомами. Контур клеточной оболочки на некоторых участках приобретает легкую «смазанность». Количество транспортных везикул варьирует, но около ядра отмечаются «пустые» локусы цитоплазмы.

В популяции светлых ЭК ко второй подгруппе относятся клетки, имеющие расширенные профили с плохо выраженными структурно-функциональными зонами и почти гладкую плазмалемму. Кариоплазма ядер разрыхлена и включает различные по размерам локусы полного просветления (рис. 2, а). Ядерная оболочка изредка содержит небольшие по величине участки выраженного расхождения мембран. Митохондрии встречаются часто, но почти всегда имеют локально

или полностью просветленный матрикс и малочисленные кристы. Элементы АГ содержат лишь отдельные клетки, тогда как каналы ГЭР встречаются часто, но их просветы расширены, а количество прикрепленных рибосом резко снижено. В составе плазматической мембраны четкие участки сменяются «смазанными». Транспортные везикулы распределяются крайне неравномерно, часто локусы плотного их скопления сменяются участками цитоплазмы, содержащими лишь цитогранулы. Прикрепленные везикулы также распределяются кластерами. Особенностью светлых клеток второй подгруппы является обилие миелиноподобных включений, располагающихся вблизи ядра, на периферии клеток, а также внутри крупных электронно-прозрачных выростов цитоплазмы, спускающихся в просвет МС.

В популяции темных ЭК клетки второй подгруппы немногочисленны и по морфологии близки к гиперосмированным. Их узкие профили заметно изрезаны (рис. 2, б), ядра резко уплотнены и окружены кариолеммой со слабо отечным перинуклеарным пространством. Митохондрии часто имеют полностью набухший матрикс и содержат мало крист. АГ формируют цистерны с дилатированными просветами, заполненными электронно-прозрачным содержимым. Каналы ГЭР малочисленны, не расширены, но почти лишены прикрепленных рибосом. В цитоплазме выявляют-

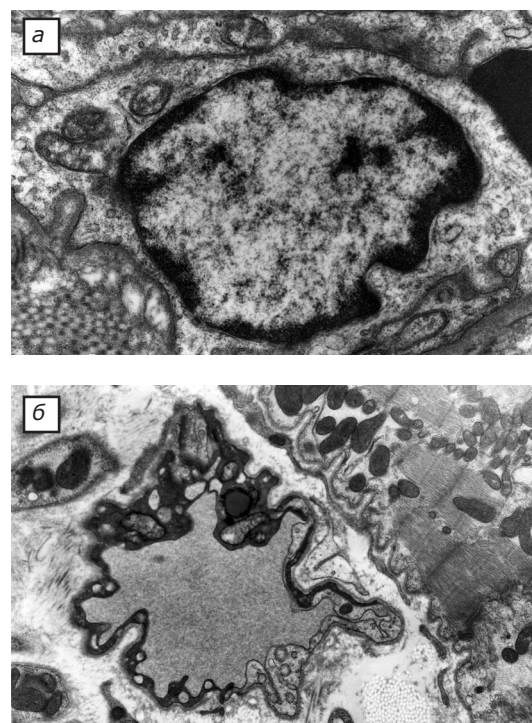


Рис. 2. Ультраструктура микроциркуляторного русла миокарда ПП в конце окклюзии аорты при хирургической коррекции ВПС в условиях ИК в режиме умеренной гипотермии и защиты миокарда раствором «Кустодиол»: а – разрыхленная кариоплазма в ядре светлой ЭК у пациента в возрасте 17 мес., ув. $\times 16\,600$; б – тонкие, извилистые профили темных ЭК второй разновидности у пациента в возрасте 18 мес., ув. $\times 10\,000$.

ся многочисленные локусы полного просветления цитоплазмы. Транспортные везикулы в отдельных клетках не определяются, тогда как в других – наблюдается так называемая картина «кипящей» цитоплазмы.

Отечные ЭК в группах 1 и 2 морфологически сходны; в конце окклюзии аорты в них накапливается большое количество миелоноподобных телец. Гиперосмированные ЭК обладают гомогенно-плотной цитоплазмой и также не различаются в группах 1 и 2.

На 30-й минуте реперфузии миокарда у детей группы 2 согласно критерию Стьюдента регистрируется статистически значимое ($P < 0,05$) повышение числа светлых ЭК по сравнению с доокклюзионным этапом ($25,06 \pm 2,58\%$). Доля ЭК основного типа сохраняется достоверно ниже ($40,33 \pm 2,84\%$), а отечных выше ($4,56 \pm 0,92\%$), чем в начале операции. Число темных и гиперосмированных ЭК не имеет значимых различий с доокклюзионным этапом операции и составляет $27,77 \pm 3,23$ и $2,28 \pm 0,91\%$ (таблица). В группе 1 доля ЭК основного типа, светлых, темных и гиперосмированных недостоверно отличается от периода ишемии и доокклюзионного этапа операции и составляет $34,48 \pm 4,38$, $23,26 \pm 3,79$, $26,44 \pm 6,21$ и $1,35 \pm 0,48\%$ соответственно. Число отечных ЭК сохраняется достоверно ($P < 0,05$) выше, чем до окклюзии аорты ($14,47 \pm 5,97\%$) (таблица). Согласно оценкам достоверности различий с помощью непараметрического критерия Уилкоксона, Манна-Уитни, у детей группы 1 выявляется тенденция к сохранению в период реперфузии миокарда сниженной относительно первого этапа операции доли ЭК основного типа и повышенной численности светлых ЭК ($P = 0,07$). У детей старше года тот же критерий подтверждает отсутствие достоверной разницы между количеством отечных клеток в начале и в конце операции.

В группе 1 ультраструктура ЭК основного типа и светлых отличается полиморфизмом, но лишь небольшая часть клеток этих разновидностей имеет общую архитектуру и субклеточную организацию, сходные с доокклюзионным этапом операции. Профили большинства ЭК основного типа и светлых неравномерно расширены, а в их цитоплазме выявляются участки, лишенные органелл и цитогранул, т. е. области очагового отека цитоплазмы. Ядра характеризуют отек межмембранного пространства, глыбчатая структура кариоплазмы с чередованием участков разрыхления хроматина и локусов его резкого уплотнения. Митохондрии выглядят набухшими в той или иной степени и практически лишены крист (рис. 3, а), ГЭР и АГ вакуолизированы. Темные ЭК подразделяются на две подгруппы. Первая не отличается от типичных темных ЭК, тогда как ЭК второй подгруппы близки к гиперосмированным, причем их тонкие псевдоподии часто подвергаются отторжению в просвет МС. Во всех трех «рабочих» разновидностях ЭК выявляются клетки с цитоплазмой, насыщенной микропиноцитозными везикулами и ЭК, в которых области цитоплазмы, плотно заполненные везикулами, чередуются с участками, лишенными транспортных пузырьков.

В группе 2 большинство ЭК основного типа и светлых имеет нормальную общую архитектуру с ярко выраженными структурно-функциональными зонами. Однако в популяции светлых ЭК изредка регистрируются клетки, периферические отделы которых неравномерно расширены. Ядра представлены двумя разновидностями, из которых первая имеет четкую, слабо волнистую оболочку с большим количеством ядерных пор и кариоплазму с рыхло расположенными зернами эухроматина и тонкой полоской примембранного гетерохроматина. Ядра второй разновидности, представленные, как правило, в светлых ЭК, демонстрируют неравномерно расширенное межмембранное пространство и почти всегда слабо либо умеренно просветленную кариоплазму. Конденсированный хроматин чаще всего локализуется около кариолеммы. Большинство митохондрий имеет нормальную ультраструктуру, но иногда встречаются органеллы с резко уплотненным матриксом, в котором почти не определяются кристы. В светлых ЭК с измененной архитектурой выявляются митохондрии с признаками резкого отека матрикса и редукции крист. Пластинчатый комплекс, как правило, один на клетку и состоит из фрагментов цистерн, окруженных многочисленными вакуолями и пузырьками. Однако в

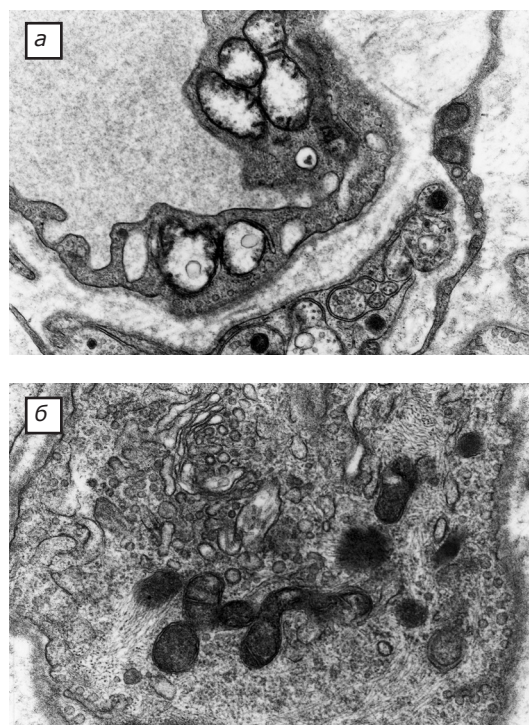


Рис. 3. Ультраструктура микроциркуляторного русла миокарда ПП на этапе реперфузии сердца после хирургической коррекции ВПС в условиях ИК в режиме умеренной гипотермии и защиты миокарда раствором «Кустодиол»: а – резко набухшие митохондрии с небольшим количеством крист и просветленным матриксом в цитоплазме ЭК основного типа у пациента в возрасте 11 мес., ув. $\times 16.600$; б – гипертрофированный комплекс Гольджи, цистерны которого окружены гладкоконтурными и окаймленными пузырьками в цитоплазме ЭК основного типа у пациента в возрасте 15 мес., ув. $\times 26.000$.

некоторых эндотелиоцитах АГ регистрируется гиперплазия АГ и диктиосомное строение 2 или даже 3 комплексов, входящих в его состав. В таких клетках иногда наблюдаются картины отшнуровывания пузырьков от поверхности цистерн Гольджи, в том числе и окаймленных, а также скопления гладкоконтурных и окаймленных пузырьков вокруг нерасширенных либо слабо расширенных цистерн, собранных в стопку (рис. 3, 6). ГЭР в одних клетках представлен разветвленной сетью каналов, имеющих узкий просвет и сравнительно много рибосом на мембранах, тогда как в других ЭК элементы ГЭР развиты слабее и представлены отдельными цистернами, на которых рибосомы распределены кластерами. Количество транспортных везикул во многих светлых ЭК и основного типа визуально велико, хотя имеется небольшая группа клеток, содержащих мало транспортных пузырьков, локализованных преимущественно около плазмалеммы.

В популяции темных ЭК, как и на предыдущих этапах операции, выделяется две разновидности клеток. В первой кариоплазма одних ядер почти равномерно зернистая, тогда как других включает множество разнообразных по размерам глыбок гетерохроматина. АГ встречается часто и, как правило, формируется группой мелких цистерн или их фрагментов, лежащих стопкой. Изредка обнаруживаются крупные, активные АГ с длинными цистернами, вблизи которых локализуются скопления окаймленных пузырьков. Ультраструктура ГЭР аналогична ЭК основного типа. Митохондрии в основном имеют нормальную ультраструктуру, хотя встречаются единичные умеренно и резко измененные. Плазмалемма активна, но цитоплазма не производит впечатления переполненной транспортными пузырьками.

Особенностью темных клеток второй разновидности являются значительно более тонкие профили. Ядра в таких ЭК часто находятся в состоянии, морфологически близком к пикнозу. Митохондрии встречаются редко, имеют крупные размеры, полностью просветленный матрикс и лишены крист. АГ и ГЭР не регистрируются. Плазмалемма клеток данной разновидности иногда почти гладкая, иногда, напротив, буквально «усыпана» узкими выростами разной длины и конфигурации. В сущности, вторую разновидность темных ЭК от типично гиперосмированных отличает лишь несколько более светлый матрикс цитоплазмы и относительная четкость всех мембранных структур.

Хотя в обеих группах детей морфология большинства отечных и гиперосмированных ЭК типична, у больных группы 2 в отдельных отечных клетках кариоплазма ядер приобретает зернистость, а в цитоплазме выявляются митохондрии с целостными короткими кристами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование свидетельствует, что до окклюзии аорты в эндотелии коронарных МС паци-

ентов с ВПС первого года жизни и больных в возрасте одного–трех лет присутствуют все морфологические разновидности ЭК, ранее установленные в клинике и эксперименте [3, 10, 12]. При этом в двух исследованных группах популяционная доля ЭК основного типа, светлых, темных, отечных и гиперосмированных значимо не различается. Вместе с тем, у детей до года четкая диагностика принадлежности ЭК к одной из пяти морфологических разновидностей затруднена. Прежде всего, это обусловлено возможностью применения всей совокупности предлагаемых ультраструктурных критериев лишь к части общей клеточной популяции. Так в целом ряде ЭК, независимо от плотности цитоплазмы, отмечается «выравнивание» степени развития органелл, принимающих участие во внутриклеточных синтезах и трансэндотелиальном переносе макромолекул, что связано с гипертрофическими процессами, происходящими в миокарде пациентов с ВПС даже в столь юном возрасте [7]. Причем степень гипертрофических и гиперпластических изменений морфологии правых отделов сердца, в том числе эндотелия предсердных МС у больных с клиническим диагнозом тетрада Фалло и межжелудочковый дефект, осложненный легочной гипертензией, определяется величиной градиента давления между правым желудочком и легочной артерией. Кроме того, у детей первого года жизни выявляются ЭК с морфологией, отличной от дифинитивной и характеризующейся отсутствием четких границ между структурно-функциональными зонами и малым количеством микропиноцитозных пузырьков, что рассматривается некоторыми исследователями как признак незаконченной дифференцировки сосудистого эндотелия [5]. Продолжение постнатальной функциональной специализации клеток миокарда при ВПС носит неспецифический характер, что подтверждается исследованиями, продемонстрировавшими высокую степень миофибриллогенеза в правом желудочке у пациентов с ВПС в возрасте около 9 мес., что является признаком незаконченной дифференцировки миоцитов [16].

Длительная тотальная ишемия миокарда в обеих группах сопровождается развитием в эндотелии МС комплекса дистрофических и компенсаторно-приспособительных изменений. Первые проявляются достоверным уменьшением доли ЭК основного типа в общей популяции и увеличением числа клеток с резко измененной морфологией, подвергающихся деструкции по типу колликационного некроза. Учитывая, что в настоящее время ЭК основного типа рассматриваются в качестве структурно-функционального базиса популяции [21], изменения в сторону уменьшения пропорции этих ЭК, несомненно, следует трактовать как признак угнетения транспортной и синтетической активности эндотелия и падения его резистентности к любым патофизиологическим воздействиям. В свою очередь, значительное увеличение в период аноксии сердца доли отечных ЭК го-

ворит о нарушении биоэнергетической функции эндотелия коронарных МС и увеличении проницаемости его плазматической мембраны [15]. К изменениям компенсаторно-приспособительного характера относится комплекс ультраструктурных реакций, характерных для торможения метаболической активности клеток [19], включая уплотнение или набухание ядер, редукцию АГ и ГЭР, а также внутримитохондриальный отек.

Реперфузия миокарда у пациентов первого года жизни не вызывает уменьшения популяционной доли отечных ЭК по сравнению с периодом аноксии, что может приводить к неравномерной гемоперфузии коронарных МС, затруднению транспорта кислорода и субстратов метаболизма к кардиомиоцитам, подключению механизмов анаэробного гликолиза и тем самым отрицательно сказываться на состоянии ультраструктуры сократительного миокарда. [24]. У детей в возрасте одного–трех лет восстановление коронарного кровотока сопровождается уменьшением (приблизительно в два раза) количества отечных ЭК по сравнению с ишемическим этапом операции, что согласно непараметрическому критерию Уилкоксона, Манна-Уитни обеспечивает отсутствие достоверной разницы популяционной доли этих клеток с доокклюзионным этапом операции. Учитывая, что у детей старше года одновременно наблюдается достоверное увеличение количества светлых ЭК, можно предположить восстановление во второй группе пациентов активности натрий-калиевой помпы плазматической мембраны, ответственной за удаление из цитоплазмы избытка жидкости, что позволяет части отечных клеток трансформироваться в светлую разновидность. В целом, эти данные подтверждают позицию авторов, рассматривающих новорожденных и детей до года как категорию пациентов, обладающих повышенной гидрофильностью тканей [22] и значительно более высокой, чем взрослый организм чувствительностью к стрессу, сопряженному с остановкой кровообращения в условиях ИК [13].

В проведенной работе особое внимание привлекает отсутствие в обеих группах детей интраоперационной динамики популяционной доли темных ЭК, так как, по данным некоторых исследователей [11, 17], толерантность темных клеток к факторам кардиохирургического стресса считается свидетельством адекватности анестезиологических мероприятий по защите миокарда в период открытого сердца. Дополнительно об этом говорят недостоверные в обеих группах детей сдвиги количества гипертрофированных клеток, поскольку гипертрофия цитоплазмы ЭК в настоящее время рассматривается как проявление более глубокой патологии клетки, нежели внутриклеточный отек [25]. Вместе с тем нельзя не отметить, что в некоторых биоптатах, полученных у детей старше 12 мес. в конце длительной тотальной ишемии сердца, все же регистрируется резкий рост числа гипертрофированных форм ЭК. В период реперфузии их коли-

чество несколько уменьшалось, скорее всего, путем слипания погибших эндотелиоцитов в просвет МС, но сохранялось значительно выше, чем до окклюзии аорты. Оценка корреляционных взаимоотношений по критерию Спирмана позволила выявить наличие на этапе реперфузии миокарда достоверной положительной связи между длительностью окклюзии аорты, продолжительностью ИК и долей гипертрофированных клеток в составе эндотелия МС. Поэтому различия, обнаруженные в популяционном составе ЭК двух групп пациентов, скорее всего не связаны с возрастом больных. Причины инициации некроdistрофических изменений эндотелия у некоторых детей старше одного года жизни, вероятно, сопряжены с большей длительностью этапа открытого сердца, сопровождающегося развитием иммуновоспалительных реакций с повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов и интенсификацией процессов перекисного окисления липидов. В свою очередь супероксид-анионы, которые образуются при взаимодействии свободных радикалов с ядерной и митохондриальной ДНК и пероксинитритом, возникающим при окислении NO, способны индуцировать развитие дисфункции эндотелия, морфологическим проявлением которой является апоптоз и некроз ЭК [1, 9].

Интраоперационная динамика ЭК основного типа и светлых позволяет рассматривать детей раннего возраста, то есть до трех лет как группу, характеризующуюся высокой чувствительностью к факторам кардиохирургического стресса. В группе 2 об этом свидетельствует тот факт, что количество ЭК основного типа в период реперфузии миокарда сохраняется достоверно ниже, а светлых клеток становится достоверно выше, чем до окклюзии аорты. Хотя у детей первого года жизни восстановление кровотока в миокарде возвращает популяционную долю этих клеток на уровень, недостоверно отличающийся от доокклюзионного, но сохраняется тенденция к уменьшению количества первых и увеличению числа вторых по сравнению с первым этапом операции. Кроме того, степень развертывания процессов внутриклеточной регенерации в эндотелии детей первого года жизни ниже, чем в тех же морфологических разновидностях ЭК у детей старше года. Так в «рабочем» эндотелии детей первого года жизни в основной массе клеток регистрируются изменения ультраструктуры органелл, характерные для ишемического и реперфузионного повреждения миокарда [14, 18]. Нормализация общей архитектоники и тонкой структуры охватывает сравнительно небольшую долю клеток. У детей в возрасте от одного до трех лет не менее половины ЭК, принадлежащих к «рабочим» разновидностям, демонстрируют хорошо дифференцирующиеся структурно-функциональные зоны и в разной степени выраженные признаки активации органелл, принимающих участие во внутриклеточных синтезах. Дополнительно у детей в возрасте от одного до трех лет реже, чем у пациентов первого года жизни, выявляются клетки «рабочих» разновидностей с очаговым отеком цитоплазмы.

ВЫВОДЫ

1. В эндотелии коронарных МС детей с ВПС раннего возраста кардиохирургический стресс вызывает повреждение клеток по типу колликативного некроза, не вызывая активации коагуляционного. При этом темные клетки, принадлежащие к «рабочим» разновидностям ЭК, демонстрируют толерантность к операционным воздействиям. Об этом свидетельствует отсутствие в обеих группах пациентов достоверных интраоперационных изменений их популяционной доли, несмотря на травматичность хирургических вмешательств, выполняемых на открытом сердце. Эти данные доказывают адекватность защиты основного этапа операции кардиоплегическим раствором «Кустодиол» и служат прогностическим признаком благоприятного течения послеоперационного периода.
2. Лабильный ультраструктурный ответ клеток основного типа и светлых, количественная динамика которых у пациентов до года и старше 12 мес. носит однонаправленный характер на этапах операции, хотя и не совпадает по степени достоверности отличий, свидетельствует о сниженном резерве адаптации коронарного эндотелия детей раннего возраста к условиям кардиохирургического стресса. Причем у детей первого года жизни восстановление коронарного кровотока инициирует относительно низкий уровень развертывания процессов внутриклеточной регенерации в этих разновидностях ЭК по сравнению с пациентами в возрасте одного–трех лет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Данилогорская Ю.А. и др. // *Кардиол. и серд.-сосуд. хирургия*. 2009. № 1. С. 4–9.
2. Белоконов Н.А., Подзолков В.П. *Врожденные пороки сердца*. М.: Медицина, 1991. 350 с.
3. Волков А.М. *Ультраструктура микрососудов миокарда при коррекции врожденного порока сердца в условиях бесперфузионной и перфузионной гипотермии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук*. Новосибирск, 2003. 41 с.
4. Грабаускене В.В. *Результаты исследования естественного течения, особенностей клиники и тактики лечения критических врожденных пороков сердца у новорожденных и детей грудного возраста: автореф. дис. ... канд. мед. наук*. Вильнюс, 1988. 38 с.
5. Гурина О.Ю., Куприянов В.В., Миронов А.А., Миронов В.А. // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1985. Т. 88, № 1. С. 9–24.
6. Егорова И.Ф., Серов Р.А., Ильин В.Н., Шарыкин А.С. // *Архив патологии*. 2001. Т. 63, № 2. С. 36–39.
7. Ерохина И.Л., Селиванова Г.В., Власов Т.Д. // *Цитология*. 1995. Т. 37, № 1/2. С. 101–108.
8. Захарова В.П., Демянчук В.Б., Лазорилинец В.В. // *Тезисы 1-й ежегодной сессии НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН*. М., 1997. С. 36–37.
9. Иванов С.Г., Ситникова М.Ю., Шляхто Е.В. // *Кардиология СНГ*. 2006. № 4. С. 267–270.
10. Иванова А.Г. *Ультраструктура микроциркуляторного русла миокарда больных ишемической болезнью сердца на этапах аортокоронарного шунтирования: автореф. дис. ... канд. мед. наук*. М., 1992. 27 с.
11. Иванова А.Г., Шереметьева Г.Ф., Белов Ю.В. // *Пятые научные чтения, посвященные памяти академика Е.Н. Мешалкина*. Новосибирск, 2006. С. 139.
12. Казанская Г.М. *Ультраструктура эндотелия капилляров миокарда при охлаждении, длительном прерывании кровотока и в отдаленные сроки после экспериментов: автореф. дис. ... канд. мед. наук*. Новосибирск, 1995. 18 с.
13. Мерунко А.А., Корбут А.А. // *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 1997. № 2. С. 97–98.
14. Непомнящих Л.М. *Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце*. Новосибирск, 1991.
15. Сагач В.Ф., Фролькис И.И., Коваленко Т.Н., Диброва В.А. // *Физиолог. журнал*. 1991. Т. 37, № 3. С. 36–43.
16. Шебаев Г.А. *Защита миокарда при коррекции врожденных пороков сердца у детей первого года жизни: автореф. дис. ... канд. мед. наук*. М., 2004. 22 с.
17. Шереметьева Г.Ф., Иванова А.Г. // *Вестн. Росс. Акад. Мед. Наук*. 1997. № 11. С. 35–39.
18. Шипулин В.М., Сапрыгина О.В. и др. // *Патолог. кровооб. и кардиохирургия*. 2005. № 4. С. 46–50.
19. Chiavarelli R., Macchiarelli G., Familiari G. et al. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1989. V. 37. P. 151–157.
20. Isomura T., Hisatomi K., Inuzuka H. et al. // *Kurume Med. J.* 1990. V. 37, № 3. P. 177–183.
21. Kazanskaya G.M., Volkov A.M., Karaskov A.M. et al. // *Microvasc. Res.* 1999. V. 58. P. 250–267.
22. Maehara T., Novak I., Elliott M.J. // *Eur. J. Cardiothor. Surg.* 1992. № 5. P. 258–265.
23. Matsuda H., Hirose H., Nakano S. et al. // *Jpn. Circulat. J.* 1986. V. 50, № 10. P. 1040–1043.
24. Tveita T., Myklebust R., Ytrehus K. // *Res. Exp. Med. (Berl.)*. 1998. V. 197, № 5. P. 243–254.
25. Volkov A.M., Kazanskaya G.M., Karaskov A.M., Shunkin A.V. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996. V. 793. P. 423–426.

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF CORONARY MICROVESSEL ENDOTHELIUM WHEN REPAIRING CONGENITAL HEART DISEASE IN INFANTS AND 1 TO 3 YEAR-OLD CHILDREN

G.M. Kazanskaya, Ye.V. Uglova, V.N. Lomivorotov, A.M. Volkov, A.V. Shunkin, A.M. Karaskov

While repairing a congenital heart disease in children under 3 years old in the conditions of cardiopulmonary bypass and moderate hypothermia (33–34 °C) and protecting the myocardium with «Custodiol» solution, we carried out an ultrastructural analysis of intraoperative dynamics of various morphological types of endothelial cells in the microvessels of the coronary bed. It was found out that cardiosurgical stress in both infants and 1 to 3-year old children leads to injury of endothelium similar to colliquative necrosis and does not activate coagulation necrosis. The fact that «Custodiol» cardioplegic solution provides adequate protection of the main stage of surgery is verified by the absence of significant changes in the population part of dark endothelial cells in both groups of children. A labile ultrastructural response of the main-type cells and light ones, the quantitative dynamics of which in infants and older children is also of a unidirectional nature, suggests that coronary endothelium in patients at an early age has a somewhat lowered reserve to adapt to cardio-surgical stress.

Key words: endothelium, microvessels, myocardium, ultra-structure, ischemia, cardiac reperfusion, congenital heart disease.