

УДК: 616.131-091.8-053.1/.31-001.8-036.12-02:618.3-06

Калужина О.В.

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ НА МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ У ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ

Харьковский национальный медицинский университет,

Гипоксия сопровождается большинством осложнений беременности и негативно сказывается на формировании сердечно-сосудистой системы развивающегося организма. Темой исследования стало выявить морфологические особенности легочной артерии у плодов и новорожденных, подвергшихся влиянию хронической внутриутробной гипоксии. Наше экспериментальное исследование по моделированию вышеуказанного состояния проводилось на лабораторных крысах линии WAG. Материалом для исследования послужила ткань легочной артерии. Морфологическая обработка включала макроскопический, микроскопический, гистохимический, иммуногистохимический, морфометрический, статистический методы. Макроскопических различий между сосудами контрольной (первой) и исследуемой (второй) групп не наблюдалось. При этом микроскопически в группе с гипоксией сравнительно с контрольной отмечалось уплотнение эндотелиоцитов интимы с нарастанием ядерно-цитоплазматического соотношения, дистрофическими изменениями в ядре, сморщиванием цитоплазмы, и как следствие – усиление десквамации клеток, что также связано с утолщением базальной мембраны. Во второй группе в отличие от первой определялось меньшее количество гладких миоцитов в поле зрения, увеличение соотношения относительных объемов интимы-меди и адвентиции в сторону первых и усиление фунгинофилии адвентиции, что может говорить о нарастании склеротических процессов в стенке легочной артерии. Таким образом, хроническая внутриутробная гипоксия вызывает альтеративно-склеротические изменения в стенке данного сосуда у плодов и новорожденных.

Ключевые слова: гипоксия, легочная артерия, крысы, плоды, новорожденные

Наше исследование является частью научно-исследовательской работы кафедры патологической анатомии Харьковского национального медицинского университета «Патоморфологические особенности формирования плода и новорожденного под влиянием патологии матери» (номер государственной регистрации 0110U001805).

Введение

Одним из основных факторов, обуславливающих дезинтеграционные процессы адаптации к внеутробной жизни и своеобразии формирования сердечно-сосудистой, дыхательной систем является гипоксия. Большинство осложнений беременности (преэклампсия), соматические и инфекционные заболевания беременной, воздействие неблагоприятных факторов сопровождаются дефицитом кислорода плода. Сердечно-сосудистая система является одной из самых уязвимых при внутриутробной гипоксии плода. По результатам разных авторов частота постгипоксических осложнений с ее стороны у новорожденных, особенно недоношенных, составляет 40-70 % [1].

Современная наука накопила знания о морфологических изменениях надпочечников [2], гипофиза [3], сердца [4], органов мочевыделительной системы [5] при внутриутробной гипоксии. В исследованиях зарубежных авторов освещаются вопросы, посвященные влиянию хронической внутриутробной гипоксии (ХВГ) плода на морфологию аорты [6, 7]. Тогда как морфологические исследования, посвященные изменениям легочной артерии (ЛА) под влиянием ХВГ практически отсутствуют.

Цель исследования

Выявить морфологические особенности легочной артерии (ЛА) у плодов и новорожденных, подвергшихся влиянию хронической внутриутробной гипоксии (ХВГ).

Материалы и методы

В ходе исследования на лабораторных крысах линии WAG был поставлен эксперимент по моделированию внутриутробной гипоксии с асфиксией новорожденного в родах. Вышеуказанные лабораторные животные были выбраны ввиду наличия у них максимально близкого к человеку типа взаимоотношения материнского и фетального кровообращения, гемохориального характера плацентации и дискоидального типа плаценты одновременно. С целью моделирования внутриутробной гипоксии с асфиксией новорожденных в родах беременных самок крыс подвергали высотному гипоксическому влиянию, которое соответствовало 7500 м, с момента регистрации беременности и до момента родоразрешения в течение 20 минут каждый день в одно и то же время.

Все экспериментальные крысята были разделены на две группы: 1-я группа – контрольная – 18 случаев (плоды и новорожденные от матерей, которые не подвергались высотной гипоксии); 2-я группа – исследуемая – 16 случаев (плоды и новорожденные от матерей, подвергшихся высотному гипоксическому влиянию). Эвтаназии подвергалось потомство и самки. После чего производились вскрытия животных, и забиралась ткань ЛА для морфологического исследования. Для этого кусочки ткани указанного сосуда фиксировались в 10 % растворе нейтрального формалина, подвергались стандартной парафиновой проводке через спирты возрастаю-

щей концентрации, раствор Никифорова (96 % спирт и диэтиловый эфир в соотношении 1:1), хлороформ, затем заливали парафином. Серийные срезы толщиной $4-5 \times 10^{-6}$ м делали из приготовленных блоков на микротоме Microm HM-340. Морфологическая обработка включала в себя рутинные гистологические, гистохимические и морфометрические методы. С помощью микроскопа Olympus BX-41 (Япония) с использованием программ Olympus DP-Soft (Version 3:1) и Microsoft Excel проводили комплекс морфологических и морфометрических исследований. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, методом по Маллори. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах, толщиной $5-6 \times 10^{-6}$ м прямым методом Кунса по методике Brosnan. Гладкие миоциты типировали моноклональными антителами к Anti-Human Smooth Muscle Actin (DAKO, Дания). Данные, полученные в результате морфометрического исследования, статистически обрабатывали.

Все манипуляции с животными выполнялись согласно правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986), директивы Совета Европейского экономического общества по защите позвоночных животных (Страсбург, 24.11.1986).

Результаты исследования и их обсуждение

При макроскопическом исследовании с помощью лупы ($\times 3$, 8 диоптрий) стенка ЛА была эластичной, имела гладкую и блестящую интиму в контрольной и исследуемой группах. Микроскопическое исследование выявило различия между группами. В контрольной группе стенка сосуда состояла из внутренней, средней и наружной оболочек. Интима включала в себя эндотелий, базальную мембрану, сплетение эластических волокон и без четких границ переходила в медию. Учитывая это, мы определяли относительные объемы tunica intima и tunica media вместе ($62,25 \pm 11,43$ %) и tunica adventitia отдельно ($37,75 \pm 11,43$ %). Эндотелий представлял собой пласт одноядерных клеток, располагающихся на базальной мембране, средней высоты $3,20 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ м и ширины $7,12 \pm 0,15 \times 10^{-6}$ м. Средняя площадь ядер эндотелиоцитов была равна $6,17 \pm 0,14 \times 10^{-11}$ м², средняя площадь цитоплазмы – $12,17 \pm 0,40 \times 10^{-11}$ м², ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦС) – $0,57 \pm 0,02$. Площадь полей десквамации составила $2,40 \pm 0,09$ клеток в одном поле зрения ($\times 1000$). Базальная мембрана – тонкая, эозинофильная. Подэндотелиальный шар был представлен тонкофибрилярной соединительной тканью, клетками звездчатой формы, гладкими миоцитами. Гладкие миоциты равномерно располагались в толще стенки ЛА с плотностью $28,20 \pm 0,63$ клеток в поле зрения ($\times 1000$). Коллагеновые и эластические волокна, гладкомышечные клетки формировали tunica media. Относи-

тельный объем эластических и коллагеновых волокон составил $59,57 \pm 11,57$ % и $40,43 \pm 11,57$ % соответственно. Наружная оболочка формировалась коллагеновыми и эластическими волокнами, умеренно полнокровными кровеносными сосудами (vasa vasorum), нервными волокнами без признаков дистрофических изменений и лимфатическими сосудами. Умеренная фуксинофилия наблюдалась в адвентициальной оболочке при окраске ЛА пикрофуксином по ван Гизону.

Вышеописанное строение сосуда животного соответствовало общепризнанному представлению о физиологической норме [8].

В исследуемой группе микроскопически стенка ЛА также состояла из внутренней, средней и наружной оболочек. При этом показатели относительных объемов tunica intima и tunica media вместе ($76,39 \pm 10,62$ %) увеличивались по сравнению с контрольными, а объем отдельно tunica adventitia ($23,61 \pm 10,62$ %) соответственно уменьшался, что, по нашему мнению, может быть связано с развитием склеротических изменений в этих оболочках сосуда в результате продолжительного воздействия гипоксии. Эндотелиальные клетки были одноядерными, располагались на базальной мембране. Их средняя высота составила $2,96 \pm 0,03 \times 10^{-6}$ м, ширина – $7,94 \pm 0,11 \times 10^{-6}$ м, что было достоверно сравнительно с контролем ($p < 0,001$) и указывало на уплощение эндотелиального покрова в исследуемой группе. Средняя площадь ядер эндотелиоцитов – $6,91 \pm 0,12 \times 10^{-11}$ м², что было достоверно отклонено от контрольных показателей ($p < 0,001$), средняя площадь цитоплазмы – $9,90 \pm 0,21 \times 10^{-11}$ м² ($p < 0,001$), ЯЦС – $0,75 \pm 0,02$ ($p < 0,001$). Базальная мембрана была эозинофильная, несколько утолщена, что может являться причиной нарушения метаболизма в эндотелиоцитах [9]. Об этом свидетельствует увеличение площади ядер клеток с появлением оптических пустот и пикнотического сморщивания и подтверждается сморщиванием цитоплазмы, что впоследствии приводит к десквамации погибших клеток. Так, площадь полей десквамации нарастала и составила $4,87 \pm 0,15$ клеток в одном поле зрения ($\times 1000$), и достоверно отличалась от первой группы ($p < 0,001$). Подэндотелиальный шар состоял из тонкофибрилярной соединительной ткани, клеток звездчатой формы, гладких миоцитов. Последние располагались преимущественно равномерно в толще стенки ЛА, плотность которых в поле зрения ($\times 1000$) была значительно меньше контрольных значений ($20,00 \pm 0,35$ клеток), и достоверно отличалась от них ($p < 0,001$). Tunica media формировали коллагеновые и эластические волокна, гладкомышечные клетки. При этом относительный объем первых составил $34,35 \pm 11,87$ %, а вторых – $65,65 \pm 11,87$ %. Преобладание эластических волокон в стенке ЛА крыска, несмотря на общепризнанный факт, что гипоксия стиму-

лирует синтез коллагенов в организме человека [10], вероятнее всего, может иметь несколько объяснений. Первое: это связано с особенностями организма лабораторной крысы, так уже описаны случаи уменьшения выработки коллагенов у свиньи в эксперименте по моделированию гипоксии [11]; второе: с активацией белков

фибулинов, фибриллинов и эмилинов, отвечающих за формирование эластических волокон [12]. Вышесказанное подтверждается данными собственных исследований, в частности показателями относительных объемов коллагеновых и эластических волокон в ЛА плодов и новорожденных человека и крысы.

Таблица 1.
Относительные объемы коллагеновых и эластических волокон легочной артерии (%)

	Эластические волокна	Коллагеновые волокна
Контроль плоды и новорожденные человека	48,0±9,12	52,0±9,12
Контроль плоды и новорожденные крысы	59,57±11,57	40,43±11,57

Как следует из таблицы 1 в норме в ЛА плода и новорожденного человека преобладают коллагеновые волокна, тогда как в ЛА плода и новорожденного крысы – эластические волокна.

Коллагеновые и эластические волокна, местами полнокровные кровеносные (vasa vasorum) сосуды, нервные волокна без признаков дистрофических изменений, лимфатические сосуды формировали наружную оболочку. В ней отмечалось усиление фуксинофилии при окраске ЛА пикрофуксином по ван Гизон, что свидетельствует о склеротических изменениях [13].

Выводы

1. Хроническая внутриутробная гипоксия оказывает неблагоприятное воздействие на морфологическое состояние легочной артерии плодов и новорожденных, что проявляется в утолщении базальной мембраны интимы, как следствие ухудшения трофики эндотелия, что приводит к изменению соотношения его ядра и цитоплазмы, уплощению эндотелиоцитов, дистрофическим процессам с последующей десквамацией клеток.

2. Плотность расположения гладких миоцитов резко уменьшается в условиях влияния гипоксии, что может негативно отразиться на сократительной способности стенки сосуда.

3. При воздействии хронической внутриутробной гипоксии изменяется соотношение коллагеновых и эластических волокон в пользу вторых, что может быть расценено как особенность организма лабораторного животного либо являться следствием активации белков, ответственных за формирование волокон последнего вида в таких условиях.

Перспективность исследования

Провести иммуногистохимическое исследование адгезивных свойств эндотелиальных клеток, коллагенов в стенке легочной артерии.

Литература

1. Виноградова И.В. Особенности состояния сердечно-сосудистой системы у новорожденных с экстремально низкой массой тела / И.В. Виноградова, М.В. Краснов, Н.Н. Иванова // Современные технологии в медицине. – 2009. – № 2. – С. 82-86.
2. Андреев А.В. Перинатальная гипоксия как причина патологических изменений надпочечников плодов и новорожденных / А.В. Андреев, Г.И. Губина-Вакулук // Международный медицинский журнал. – 2013. – № 3. – С. 65-69.
3. Кихтенко Е.В. Особенности эмбриогенеза адренотропных клеток аденогипофиза плода в условиях хронической внутриут-

робной гипоксии / Е.В. Кихтенко // Украинский медицинский альманах. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 34-36.

4. Мекенбаева Р.Т. Клинические и морфологические изменения в миокарде у умерших новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию / Р.Т. Мекенбаева // Clinical medicine of Kazakhstan. – 2013. – № 3 (29). – С. 11-15.
5. Мирошниченко М.С. Влияние хронической внутриутробной гипоксии на морфофункциональные особенности органов мочевыделительной системы плодов и новорожденных / М.С. Мирошниченко, В.Д. Марковский, И.В. Сорокина // Морфология. – 2013. – Т. VII, № 2. – С. 57-60.
6. Giussani D.A. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress / D.A. Giussani, Emily J. Camm, Youguo Niu [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – V. 7, № 1 (2). – P. e31017. [Electronic resource]. – Режим доступа : doi:10.1371/journal.pone.0031017.
7. Thompson J.A. Chronic intrauterine hypoxia interferes with aortic development in the late gestation ovine fetus/ J.A. Thompson, B.S. Richardson, R. Gagnon [et al.] // Journal of Physiology. – 2011. – № 589 (13). – P. 3319-3332.
8. Гамбарян П.П. Крыса / П.П. Гамбарян, Н.М. Дукельская. – М. : Советская наука, 1955. – 254 с.
9. Liliensiek S.J. Characterization of Endothelial Basement Membrane Nanotopography in Rhesus Macaque as a Guide for Vessel Tissue Engineering / S.J. Liliensiek, P. Nealey, C.J. Murphy // Tissue Engineering. – 2009. – № 9 (15). – P. 2643-2651.
10. Falanga V. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1 / V. Falanga, L. Zhou, T. Yufit // Journal of Cellular Physiology. – 2002. – № 191(1). – P. 42-50.
11. Levene C.I. Effect of hypoxia and carbon monoxide on collagen synthesis in cultured porcine and bovine aortic endothelium / C.I. Levene, C.P. Bartlet, C. Fornieri [et al.] // British Journal of Experimental Pathology. – 1985. – № 66. – P. 399-408.
12. Камоева С.В. Ферментные и генетические аспекты патогенеза пролапса тазовых органов и дисфункции тазового дна у женщин / С.В. Камоева // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2013. – № 3. – С. 31-35.
13. Побережник Г.А. Морфологические изменения слизистой оболочки гайморовой пазухи в зависимости от причины верхнечелюстного синусита / Г.А. Побережник, О.А. Омельченко // Екологічні проблеми експериментальної та клінічної медицини. – 2013. – № 1. – С. 325-338.

References

1. Vinogradova I.V. Osobnosti sostoyaniya serdechno-sosudistoy sistemy u novorozhdennykh s'ekstremal'no nizkoy massoy tela / I.V. Vinogradova, M.V. Krasnov, N.N. Ivanova // Sovremennye tehnologii v medicine. – 2009. – № 2. – S. 82-86.
2. Andreev A.V. Perinatal'naya gipoksiya kak prichina patologicheskikh izmenenij nadpocheknikov plodov i novorozhdennykh / A.V. Andreev, G.I. Gubina-Vakulik // Mezhdunarodnyj medicinskiy zhurnal. – 2013. – № 3. – S. 65-69.
3. Kihchenko E.V. Osobnosti 'embriogeneza adrenokortikotropitsitov adenogipofiza ploda v usloviyah hronicheskoy vnutritrubnoy gipoksii / E.V. Kihchenko // Ukrain's'kij medicinskiy al'manah. – 2009. – T. 1, № 1. – S. 34-36.
4. Mekenbaeva R.T. Klinicheskie i morfologicheskie izmeneniya v miokarde u umershih novorozhdennykh, perenesshih perinatal'nyuyu gipoksiyu / R.T. Mekenbaeva // Clinical medicine of Kazakhstan. – 2013. – № 3 (29). – S.11-15.
5. Miroshnichenko M.S. Vliyaniye hronicheskoy vnutritrubnoy gipoksii na morfofunktsional'nye osobennosti organov mochevydelitel'noy sistemy plodov i novorozhdennykh / M.S. Miroshnichenko, V.D. Markovskiy, I.V. Sorokina // Morfologiya. – 2013. – T. VII, № 2. – S. 57-60.
6. Giussani D.A. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress / D.A. Giussani, Emily J. Camm, Youguo Niu [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – V. 7, № 1 (2). – P. e31017. [Electronic resource]. – Режим доступа : doi:10.1371/journal.pone.0031017.

7. Thompson J.A. Chronic intrauterine hypoxia interferes with aortic development in the late gestation ovine fetus/ J.A. Thompson, B.S. Richardson, R. Gagnon [et al.] // *Journal of Physiology*. – 2011. – № 589 (13). – P. 3319-3332.
8. Gambaryan P.P. Krysa / P.P. Gambaryan, N.M. Dukel'skaya. – М. : Sovetskaya nauka, 1955. – 254 s.
9. Liliensiek S.J. Characterization of Endothelial Basement Membrane Nanotopography in Rhesus Macaque as a Guide for Vessel Tissue Engineering / S.J. Liliensiek, P. Nealey, C.J. Murphy // *Tissue Engineering*. – 2009. – № 9 (15). – P. 2643-2651.
10. Falanga V. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1 / V. Falanga, L. Zhou, T. Yufit // *Journal of Cellular Physiology*. – 2002. – № 191 (1). – P. 42-50.
11. Levene C.I. Effect of hypoxia and carbon monoxide on collagen synthesis in cultured porcine and bovine aortic endothelium / C.I. Levene, C.P. Bartlet, C. Fornieri [et al.] // *British Journal of Experimental Pathology*. – 1985. – № 66. – P. 399-408.
12. Kamoeva S.V. Fermentnye i geneticheskie aspekty patogeneza prolapsa tazovyh organov i disfunkcii tazovogo dna u zhenshin / S.V. Kamoeva // *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. – 2013. – № 3. – S. 31-35.
13. Poberezhnik G.A. Morfologicheskie izmeneniya slizistoj obolochki gajmarovoj pazuhi v zavisimosti ot prichiny verhnechelyustnogo sinusita / G.A. Poberezhnik, O.A. Omel'chenko // *Ekologichni problemi eksperimental'noi ta klinichnoi medicini*. – 2013. – № 1. – S. 325-338.

Реферат

ВПЛИВ ХРОНІЧНОЇ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОЇ ГІПОКСІЇ НА МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ЛЕГЕНЕВОЇ АРТЕРІЇ ПЛОДІВ ТА НОВОНАРОДЖЕНИХ

Калужина О.В.

Ключові слова: гіпоксія, легенева артерія, щури, плоди, новонароджені

Гіпоксія супроводжує більшість ускладнень вагітності та негативно позначається на формуванні серцево-судинної системи організму, що розвивається. Темою дослідження стало виявити морфологічні особливості легеневої артерії у плодів та новонароджених, які зазнали впливу хронічної внутрішньо-утробної гіпоксії. Наше експериментальне дослідження з моделювання вищезазначеного стану проводилося на лабораторних щурах лінії WAG. Матеріалом для дослідження слугувала тканина легеневої артерії. Морфологічна обробка включала макроскопічний, мікроскопічний, гістохімічний, імуногістохімічний, морфометричний, статистичний методи. Макроскопічних відмінностей між судинами контрольної (першої) та досліджуваної (другої) груп не спостерігалось. При цьому мікроскопічно в групі з гіпоксією порівняно з контрольною зазначалося сплюснення ендотеліоцитів інтими з наростанням ядерно-цитоплазматичного співвідношення, дистрофічними змінами в ядрі, зморщенням цитоплазми і як наслідок – посилення десквамації клітин, що також пов'язане з потовщенням базальної мембрани. У другій групі на відміну від першої була менша кількість гладких міоцитів у полі зору, збільшення співвідношення відносних обсягів інтими-медії та адвентиції в бік перших і посилення фуksiнофілії адвентиції, що може вказувати на наростання склеротичних процесів у стінці легеневої артерії. Таким чином, хронічна внутрішньоутробна гіпоксія спричиняє альтеративно-склеротичні процеси у стінці даної судини плодів і новонароджених.

Summary

INFLUENCE OF CHRONIC INTRAUTERINE HYPOXIA ON MORPHOLOGICAL STATE OF PULMONARY ARTERY IN FETUSES AND NEWBORNS (EXPERIMENTAL RESEARCH)

Kaluzhyna O.V.

Key words: hypoxia, pulmonary artery, rats, fetus, newborn.

Hypoxia accompanies most complications of pregnancy and affects the formation of the cardiovascular system of the developing organism. The theme of the study was to identify morphological characteristics of the pulmonary artery in fetuses and infants exposed to chronic intrauterine hypoxia. Our experimental research on modeling the aforementioned condition was performed on laboratory rats line WAG. Material for the study served as the tissue of the pulmonary artery. Morphological processing included macroscopic, microscopic, histochemical, immunohistochemical, morphometric, statistical methods. Macroscopic differences between the control vessels (first) and study (second) groups were observed. It microscopically hypoxia group compared with the control mentioned flattening endothelial intima with increasing nuclear-cytoplasmic ratio, degenerative changes in the nucleus, cytoplasm shrinkage, and as a consequence - increased desquamation of cells is also associated with thickening of the basement membrane. In the second group unlike the first was fewer smooth muscle cells in the visual field, increasing the value of the relative amounts of intima-media and adventitia towards strengthening fuksiноfilii first and adventitia, which may indicate the rise of sclerotic processes in the wall of the pulmonary artery. Thus, chronic intrauterine hypoxia causes of alternative-sclerotic processes in the vessel wall of the fetus and newborn.