

Ιστολογικές μεταβολές του αορτικού τοιχώματος υπό μηχανική τάση

ΣΚΟΠΟΣ Είναι γνωστό ότι η αορτή ανταποκρίνεται στις ενδοαυλικές πιέσεις με μεταβολή των διαστάσεών της. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των δομικών-ιστολογικών αναδιατάξεων του αορτικού τοιχώματος που επέρχονται μετά από την επίδραση διαφορετικών επιπέδων μηχανικής τάσης. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Χρησιμοποιήθηκαν 35 λευκά αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας της ίδιας ηλικίας. Η κατιούσα θωρακική αορτή αφαιρέθηκε με μέση στερνοτομή και ελήφθησαν επιμήκεις λωρίδες, που υποβλήθηκαν σε προεπιλεγμένα επίπεδα μηχανικής τάσης σε συσκευή μονοαξονικού εφελκυσμού. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα Karnowski υπό ήλιοτε ήλιη τάση, αφυδατώθηκαν και εμπεδώθηκαν σε παραφίνη. Η διαδικασία επαναλήφθηκε σε διαφορετικά επίπεδα τάσης που κάλυπταν όλο το εύρος των δυναμικά ασκούμενων στο τοίχωμα τάσεων, από μηδενικές έως εξαιρετικά υψηλές. Η διάταξη των ινών της ελαστίνης και του κολλαγόνου στο μέσο χιτώνα προσδιορίστηκε σε εγκάρσιες και επιμήκεις τομές του αγγείου. Για την εξέταση στο μικροσκόπιο φωτός, τα δείγματα χρωματίστηκαν με Verhoeff's elastica για την ανάδειξη της ελαστίνης και με Sirius red για την ανάδειξη του κολλαγόνου. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Τα πέταλα της ελαστίνης υπό μηδενική τάση ήταν κυματοειδή και προσανατολισμένα τόσο στον επιμήκη όσο και στον περιφερειακό άξονα του αγγείου, ενώ το κολλαγόνο ήταν συσπειρωμένο και εμφάνιζε τη μορφή δεσμίδων με σαφή περιφερειακό προσανατολισμό, καθώς και τη μορφή διαπλεκόμενων ινιδίων. Στις επιμήκεις τομές, τα πέταλα της ελαστίνης εκπτώσσονταν βαθμιαία σε χαμηλές τάσεις και ήταν σχεδόν πλήρως ευθειασμένα σε φυσιολογικές και υψηλές τάσεις, ενώ τα ινίδια του κολλαγόνου αναπροσανατολιζόνταν προς τον επιμήκη άξονα σε χαμηλές τάσεις, άρχιζαν να αποσυσπειρώνονται σε φυσιολογικές τάσεις και ευθυγραμμίζονταν μαζικά σε υψηλές τάσεις. Στις εγκάρσιες τομές, η πτύχωση των πετάλων της ελαστίνης και των περιφερειακά διευθετημένων δεσμίδων του κολλαγόνου παρέμενε αμετάβλητη προόδου της επιμήκως ασκούμενης τάσης. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Οι μικροδομικές αυτές μεταβολές υποδηλώνουν ότι η ελαστίνη ενεργοποιείται σε χαμηλές και φυσιολογικές, ενώ το κολλαγόνο σε φυσιολογικές και υψηλές τάσεις. Διαπιστώνεται συσχέτιση των ιστολογικών αναδιατάξεων του αορτικού τοιχώματος με το επίπεδο της εφαρμοζόμενης τάσης και εξηγείται ο μηχανισμός με τον οποίο η ιστολογική μικροδομή της αορτής ανταποκρίνεται στις μεταβολές των ενδοαυλικών πιέσεων.

Η αορτή αποτελεί ένα σημαντικό αιμοδυναμικό όργανο, η αποστολή του οποίου δεν περιλαμβάνει μόνο την υποδοχή και τη μεταφορά του αίματος, αλλά, μέσω της πολύπλοκης μηχανικής της συμπεριφοράς, συμβάλει ουσιαστικά στη διατήρηση της ομοιοστασίας του κυ-

κλοφορικού συστήματος.^{1,2} Είναι ένα αγγείο μεγάλης διαμέτρου, η μηχανική συμπεριφορά του οποίου οφείλεται κυρίως στον παχύτερο και καλύτερα οργανωμένο μέσο χιτώνα του. Προηγούμενες μελέτες³⁻⁶ έχουν δείξει ότι ο χιτώνας αυτός περιέχει συγκεντρικά κυλινδρικά

Ε.Μ. Κεφαλογιάννης,¹
Δ.Π. Σοκόλης,²
Μ. Κουλιούκουσα,¹
Ε. Μαρίνος,¹
Χ. Μπουντούλας,²
Π.Ε. Καραγιαννάκος²

¹Εργαστήριο Ιστολογίας
και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Αθηνών
²Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής,
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών,
Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα

Histological changes of the aortic
wall under mechanical stress

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αορτή
Ελαστίνη
Κολλαγόνο
Μηχανική τάση

Υποβλήθηκε 15.12.2005
Εγκρίθηκε 1.6.2006

πέταλα, που αποτελούν τις δομικές μονάδες του αορτικού τοιχώματος. Αυτά περιλαμβάνουν δύο θυριδωτές στιβάδες ελαστικής, που χωρίζονται μεταξύ τους από λεία μυϊκά κύτταρα, κολλαγόνο και εξωκυττάρια θεμελίδια ουσία.⁷⁻¹⁰ Η ελαστική και το κολλαγόνο είναι τα πρωταρχικά συστατικά που προσδιορίζουν τις παθητικές μηχανικές ιδιότητες του αορτικού τοιχώματος,¹¹⁻¹³ ενώ τα λεία μυϊκά κύτταρα είναι υπεύθυνα για τις ενεργητικές μηχανικές ιδιότητες και την παραγωγή του εξωκυττάρου δικτύου.^{14,15}

Οι πρωτοποριακές για την εποχή τους μελέτες των Glagov και Wolinsky,^{3,12} καθώς και αυτές που επακολούθησαν,^{5,6,16-18} κατέδειξαν τη σημασία της ιστολογικής εξέτασης του αορτικού τοιχώματος σε διάφορα επίπεδα μηχανικής τάσης για την κατανόηση της μηχανικής λειτουργίας του αγγείου. Ωστόσο, οι προαναφερθείσες μελέτες διερεύνησαν τις ιστολογικές-μικροδομικές μεταβολές του τοιχώματος μόνο στο φάσμα των φυσιολογικών ενδοαυλικών πιέσεων, παραγνωρίζοντας το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε τροχαία ατυχήματα, η αορτή υποβάλλεται σε πολύ υψηλές τάσεις, οι οποίες επιφέρουν ρήξη του ιστού. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η συμπλήρωση του υπάρχοντος κενού στη βιβλιογραφία, διερευνώντας την αλληλουχία των μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στο δίκτυο των πετάλων της ελαστικής και των ινών του κολλαγόνου του μέσου χιτώνα για ευρύ φάσμα τοιχωματικών τάσεων, που αρχίζουν από μηδενικές και ανέρχονται σε πολύ υψηλές τιμές, κοντά στο όριο αστοχίας του ιστού.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ζωικά πρότυπα και χειρουργικές διαδικασίες

Μελετήθηκαν οι αορτές 35 λευκών αρσενικών κουνελιών Νέας Ζηλανδίας της ίδιας ηλικίας και μέσου σωματικού βάρους $3,6 \pm 0,2$ kg (σταθερό σφάλμα). Οι συνθήκες στέγασης και χειρισμού των πειραματικών προτύπων ήταν σύμφωνες με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής Εταιρείας Φυσιολογίας και το Προεδρικό Διάταγμα 160/1991, με το οποίο εναρμονίστηκε η Ελλάδα στην Κοινοτική Οδηγία 609/1986. Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Ιδρύματός μας.

Τα ζωικά πρότυπα υποβλήθηκαν σε ευθανασία με ενδοφλέβια χορήγηση μεγάλης εφάπαξ δόσης νατριούχου θειοπεντάλης (Pentothal, Abbott SpA, Italy). Μετά από μέση στεφανοτομή και διάνοιξη του θώρακα, παρασκευάστηκε η κατιούσα θωρακική αορτή, εξαιρέθηκε και αποφιλώθηκε με μεγάλη προσοχή από το χαλαρό περιαορτικό ιστό. Κατά τη μεταγενέστερη ιστολογική εξέταση του αγγείου, ο έξω χιτώνας του ήταν εμφανής

σε όλα τα αορτικά δείγματα, παρέχοντας σαφή απόδειξη ότι ο μέσος χιτώνας του αγγείου είχε παραμείνει ανέπαφος. Η αορτή διανοίχθηκε κατά τον επιμήκη άξονά της και ελήφθησαν επιμήκεις λωρίδες σταθερών διαστάσεων από το άνω ημιμόριο της, μεταξύ του 2ου και 6ου ζεύγους μεσοπλευρίων αρτηριών. Όλα τα δείγματα, μέχρι την πραγματοποίηση της μελέτης του μονοαξονικού εφελκυσμού, διατηρήθηκαν σε διάλυμα φυσιολογικού ορού θερμοκρασίας δωματίου ($22 \text{ }^\circ\text{C}$).

Μονοαξονικός εφελκυσμός

Ο μονοαξονικός εφελκυσμός των αορτικών δειγμάτων έγινε στην αυτοματοποιημένη συσκευή Vitrodyne V1000 Universal Tester (Livenco Inc, Burlington, VT, USA), σε 2 ώρες από την εξαίρεσή τους, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί από το εργαστήριό μας.¹⁹⁻²¹ Η συσκευή αυτή είναι ειδική για την πραγματοποίηση μελετών μονοαξονικού εφελκυσμού σε βιολογικούς ιστούς. Για την καταγραφή της εντατικής κατάστασης των δειγμάτων φέρει δυναμοκυψέλη μέγιστου φορτίου 500 g και ευαισθησίας 0,25 g, ενώ έχει ενσωματωμένο μετρητή των μεταβολών του μήκους ευαισθησίας 10 μm . Η συσκευή είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και με κατάλληλο λογισμικό (Material Witness v2.02, Livenco Inc, Burlington, VT, USA) παρέχεται η δυνατότητα αποθήκευσης των δεδομένων για περαιτέρω επεξεργασία. Δεδομένης της δυσμενούς επίδρασης της αφυδάτωσης στις μηχανικές ιδιότητες των ιστών, τα δείγματα ήταν εμβαπτισμένα σε υδατόλουτρο με φυσιολογικό ορό ελεγχόμενης θερμοκρασίας $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (1130A, PolyScience, Niles, IL, USA), προκειμένου να διατηρούν την υγρασία τους. Με τη βοήθεια αντιολισθητικού χαρτιού, καθηλώθηκαν τα άκρα των αορτικών δειγμάτων στις αρπάγες της συσκευής εφελκυσμού, αποφεύγοντας πιθανή ολίσθησή τους κατά τη διάρκεια της μελέτης. Τυχόν μικροολισθήσεις δεν επηρέασαν τις μετρήσεις, επειδή τόσο το αρχικό μήκος όσο και οι τελικές παραμορφώσεις των δειγμάτων ήταν κατά πολύ μεγαλύτερες των πιθανών κινήσεών τους μέσα στις αρπάγες.

Η κάτω αρπάγη της συσκευής ήταν σταθερή, ενώ η άνω ήταν συνδεδεμένη με έμβολο, το οποίο ασκούσε εφελκυστικό φορτίο στα δείγματα κατά τον επιμήκη άξονά τους με ρυθμό 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Κατά κανόνα, οι αρπάγες προκαλούν τοπική διαταραχή της κατανομής των τάσεων στην περιοχή της επαφής τους με το δείγμα. Σε μικρή όμως απόσταση από τις αρπάγες, η τάση είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη σε όλη την επιφάνεια διατομής του δείγματος. Η ομοιόμορφη κατανομή της τάσης στον αορτικό ιστό εξασφαλίστηκε με επιλογή μεγάλου λόγου μήκους προς πλάτος των δειγμάτων.

Το πρωτόκολλο μελέτης της μηχανικής ανάλυσης περιλάμβανε αρχικά την προετοιμασία των αορτικών δειγμάτων, με σειρά δέκα μονοαξονικών εντατικών κύκλων με σταθερό τελικό επίπεδο επιμήκυνσης, ωστόσο τα δεδομένα του φορτίου έναντι της επιμήκυνσης να είναι καθόλα επαναλήψιμα. Η εν λόγω διαδικασία φόρτισης-αποφόρτισης έχει κριθεί στο παρελθόν ως απαραίτητη για την εξάλειψη ιξωδοελαστικών φαινομένων.²²⁻²⁴ Η τάση ορίστηκε ως ο λόγος του εφελκυστικού

φορτίου που ασκήθηκε στον επιμήκη άξονα του δείγματος προς την αρχική επιφάνεια διατομής του.^{25,26}

Οι αρχικές διαστάσεις των δειγμάτων μετρήθηκαν όταν το εφελκυστικό φορτίο άρχισε να καταγράφεται μετά από τη μηχανική προετοιμασία. Το αρχικό τους μήκος μετρήθηκε ως η απόσταση μεταξύ των αρπαγών της συσκευής εφελκυσμού και το αρχικό τους πάχος προσδιορίζοντας, με ειδική μικρομετρική συσκευή ακτίνων LASER ευαισθησίας 1 μm (LS-3100, Keyence Corp, Osaka, Japan), το πάχος σε τέσσερις ισαπέχουσες περιοχές κατά μήκος κάθε δείγματος και υπολογίζοντας το μέσο όρο τους.

Μονιμοποίηση υπό τάση

Μετά από την προετοιμασία, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταθερή τάση και παρέμειναν ακινητοποιημένα σε προκαθορισμένη παραμόρφωση. Με την επίτευξη του επιθυμητού για κάθε δείγμα επιπέδου τάσης, ακολούθησε η εμβάπτισή του, μαζί με τις αρπάγες, σε μονιμοποιητικό διάλυμα Karnovsky (3% γλουταραλδεϋδη και 1% φορμαλδεϋδη σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M, pH 7,4). Οι τάσεις που εφαρμόστηκαν στα δείγματα αντιστοιχούσαν σε χαμηλές (<80 mmHg), φυσιολογικές (80–150 mmHg) και υψηλές πιέσεις (>150 mmHg), μέχρι το σημείο ρήξης του αορτικού ιστού. Η αντιστοιχία των *in vivo* ενδοαυλικών πιέσεων, υπό φυσιολογικές και μη αιμοδυναμικές συνθήκες, με τις τάσεις που αναπτύσσονται στο αορτικό τοίχωμα υπολογίστηκε προσεγγιστικά με εφαρμογή του νόμου του Laplace.^{25,26} Η μονιμοποίηση περιέλαβε και δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανική προετοιμασία και στα οποία δεν εφαρμόστηκε κάποια τάση και αποτέλεσαν τα δείγματα αναφοράς. Επίσης, μερικά δείγματα της θωρακικής αορτής υποβλήθηκαν μόνο σε μηχανική προετοιμασία, χωρίς την εφαρμογή, στη συνέχεια, τάσης και ακολούθως μονιμοποιήθηκαν στο διάλυμα που προαναφέρθηκε, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της μηχανικής προετοιμασίας στη δομή του τοιχώματός τους. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα δείγματα παρέμειναν στο μονιμοποιητικό διάλυμα για τουλάχιστον 90 min.

Ιστολογική μελέτη

Μετά από τη μονιμοποίηση, τα δείγματα αφυδατώθηκαν με διαδοχική εμβάπτισή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλυμάτων αιθανόλης. Ακολούθησε διαύγαση του ιστού σε ξυλόλη και σκύνωσή του σε παραφίνη σε κλίβανο θερμοκρασίας 58–60 °C. Από τους κύβους παραφίνης ελήφθησαν τομές πάχους 5 μm με μικροτόμο (Microtome 820 Spencer, American Optical, USA), οι οποίες βάφτηκαν με χρώση Verhoeff's elastica για την ανάδειξη της ελαστίνης και με χρώση Sirius red (0,1% Sirius red F3BA σε διάλυμα κορεσμένου πικρικού οξέος, pH 2,0) για την ανάδειξη του κολλαγόνου. Για να αποφευχθεί η αλλοίωση των αποτελεσμάτων λόγω της παραμόρφωσης των δειγμάτων στην περιοχική καθήλωσή τους στις αρπάγες, ελήφθησαν δείγματα από το μέσο των λωρίδων. Ελήφθησαν 10–20 διαδοχικές τομές από τους κύβους παραφίνης, τόσο κατά τον επιμήκη όσο και κατά τον εγκάρσιο άξονα του αγγείου.

Η ιστολογική εξέταση των δειγμάτων έγινε σε φωτομικροσκόπιο Zeiss Axiolab (Carl Zeiss, Oberkochen, GmbH) για τον προσδιορισμό της διάταξης των ινών της ελαστίνης και του κολλαγόνου. Προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο ήταν ψηφιακή βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης Sony-iris CCD (SSC-DC38P, Sony Corp, Japan), που προέβαλλε την εικόνα του ιστολογικού παρασκευάσματος στην οθόνη ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το υπολογιστικό σύστημα παρέχει τη δυνατότητα αποθήκευσης και αρχειοθέτησης των εικόνων, στο σκληρό δίσκο, σε μορφή αρχείων υψηλής ανάλυσης TIFF για μεταγενέστερη αξιολόγησή τους. Η ιστολογική μελέτη έγινε με χρήση αντικειμενικών φακών $\times 20$ και $\times 40$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

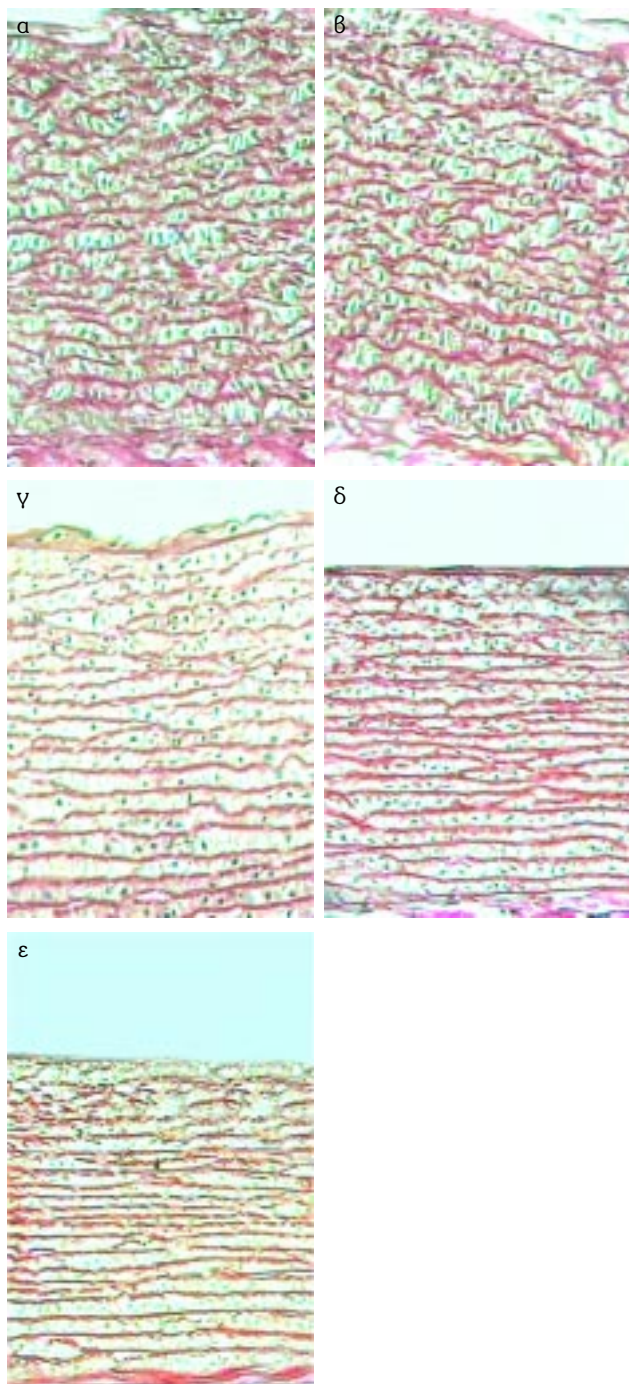
Χρώση Verhoeff's elastica

Στις εικόνες 1 και 2 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές ιστολογικές τομές του αορτικού τοιχώματος, που αναδεικνύουν την παραμόρφωση των ελαστικών ινών σε διαφορετικά επίπεδα μηχανικής τάσης. Υπό μηδενική τάση, τα πέταλα της ελαστίνης είναι κυματοειδή, προσανατολισμένα τόσο κατά τον επιμήκη όσο και κατά τον εγκάρσιο άξονα του τοιχώματος της αορτής. Η μηχανική προετοιμασία δεν επηρέασε την κατανομή στο χώρο, τον προσανατολισμό και τον κυματισμό των πετάλων της ελαστίνης. Μετά από τη μηχανική προετοιμασία, το αποτέλεσμα της εφαρμογής σταδιακά αυξανόμενης τάσης ήταν αρχικά η έκπτυξη και στη συνέχεια ο ευθειασμός, η επιμήκυνση και, τέλος, η σύμπτυξη των ελαστικών πετάλων σε υψηλότερες τάσεις (εικ. 1). Η έναρξη αυτών των αλλαγών ήταν εξαρτημένη με το επίπεδο της ασκούμενης τάσης.

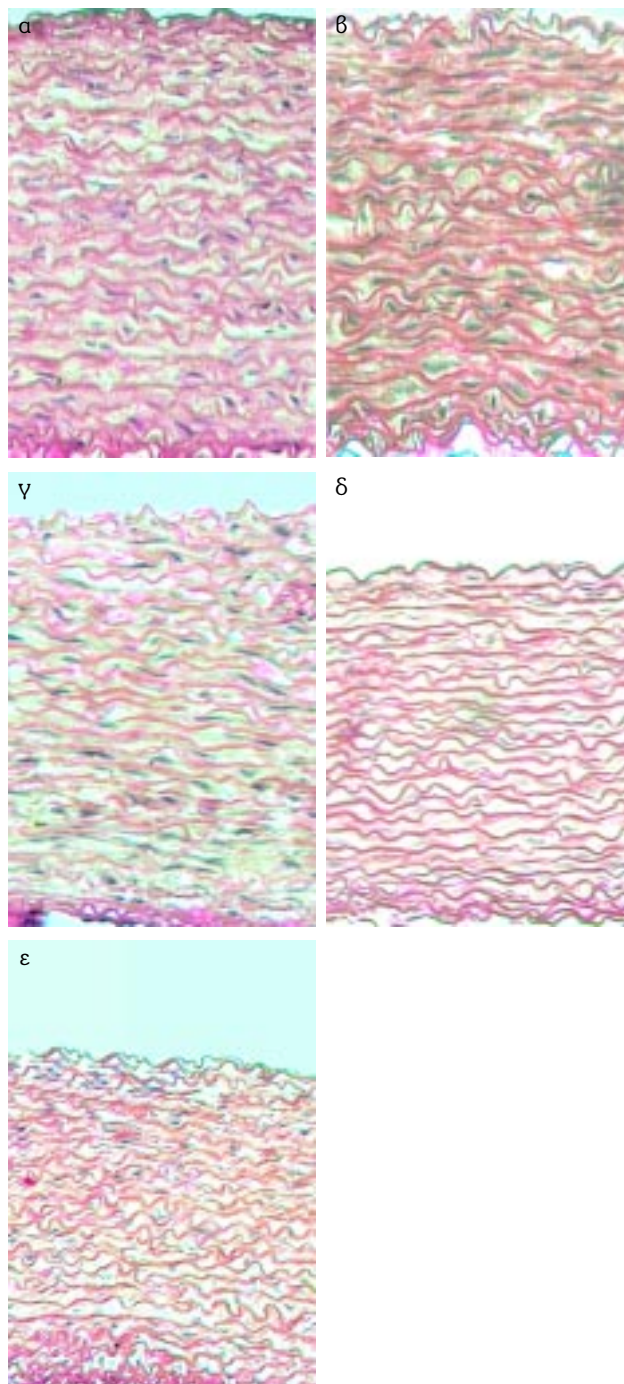
Σε χαμηλές τάσεις, ο προοδευτικός εφελκυσμός είχε ως αποτέλεσμα η κυματοειδής μορφή των ελαστικών πετάλων σταδιακά να ευθειάζεται, ενώ σε φυσιολογικά επίπεδα τάσεων όλα τα πέταλα παρουσιάζονταν ευθειασμένα. Κατά την εφαρμογή φυσιολογικών και υψηλών τάσεων σημειώθηκε επίσης διάταση και σύμπτυξη των πετάλων της ελαστίνης. Οι αλλαγές αυτές της μικροδομής του αορτικού τοιχώματος παρατηρήθηκαν μόνο στις επιμήκεις τομές, χωρίς κάποια μεταβολή στις εγκάρσιες τομές (εικ. 2).

Χρώση Sirius red

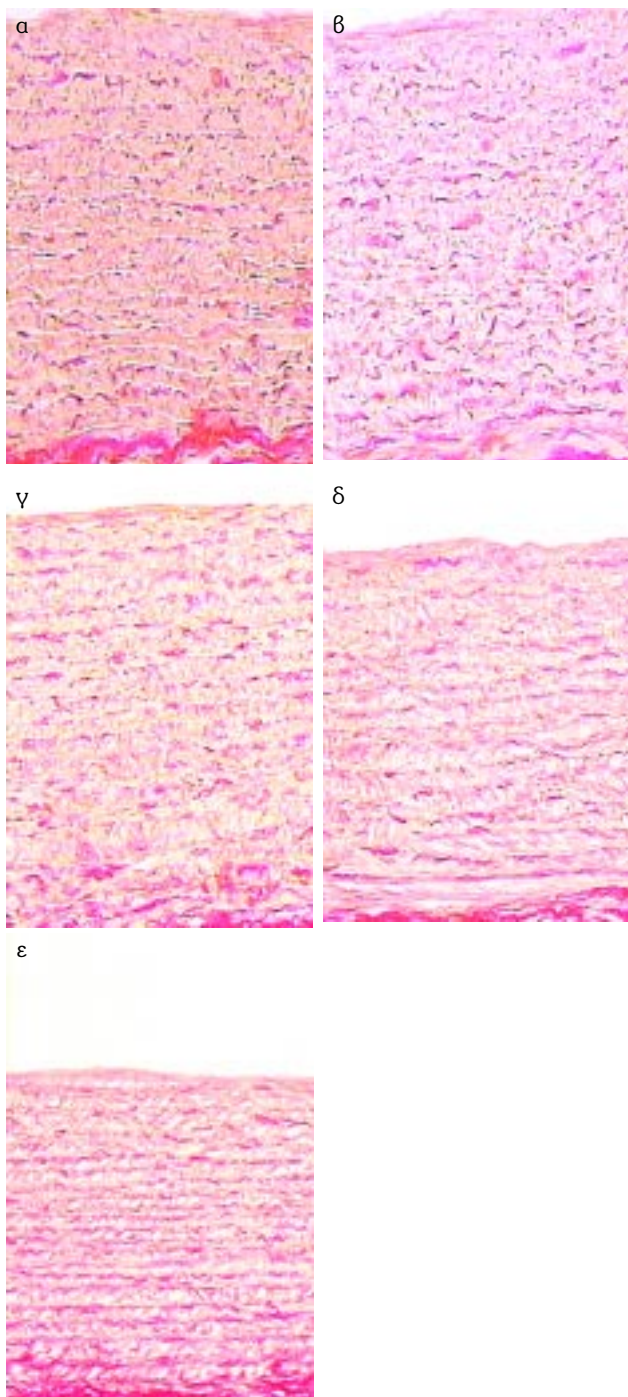
Στις εικόνες 3 και 4 φαίνεται η μορφολογία του δικτύου ινών του κολλαγόνου στο μέσο χιτώνα της αορτής, όταν αυτή υποβάλλεται σε διάφορα επίπεδα τάσης. Σε επιμήκεις τομές του αγγείου που δεν έχει υποβληθεί σε τάση είναι εμφανής η πτύχωση και η έλλειψη προ-



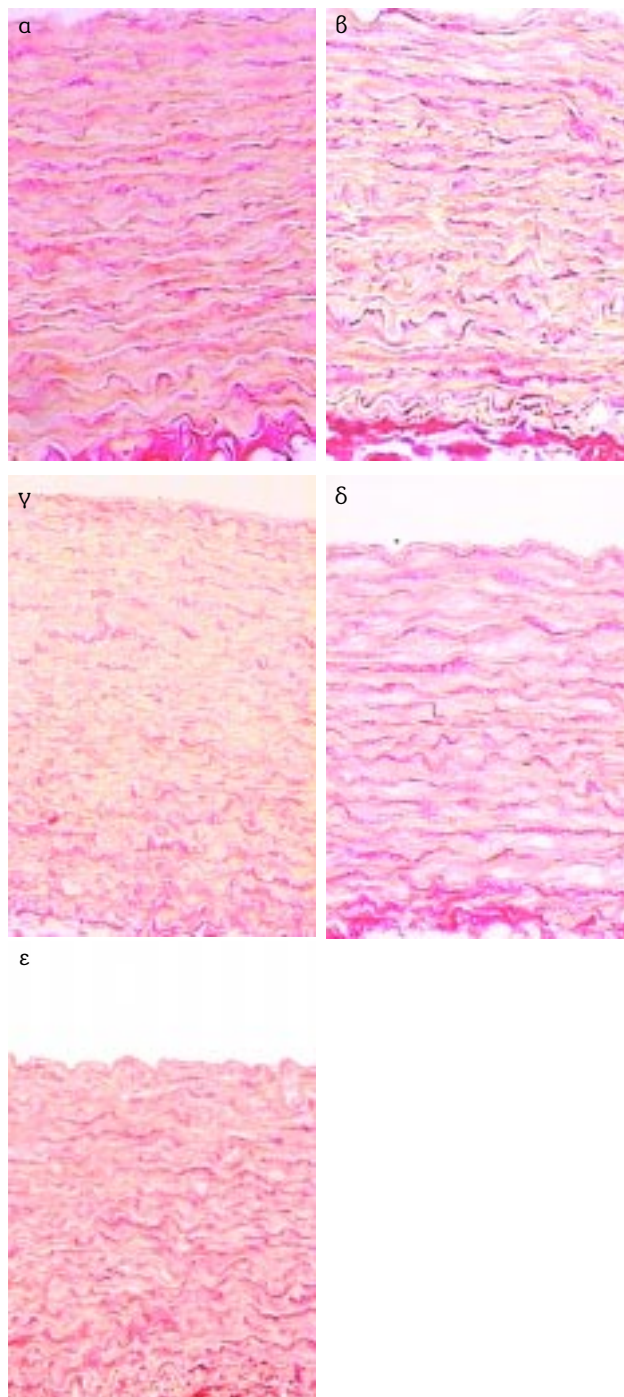
Εικόνα 1. Επιμήκειες τομές του αορτικού τοιχώματος μονιμοποιημένου υπό (α) μηδενική τάση, μηχανική προετοιμασία και διάφορα επίπεδα τάσης: (β) μηδέν, (γ) χαμηλές, (δ) φυσιολογικές και (ε) υψηλές τάσεις. Τα πέταλα και τα ινίδια της ελαστίνης βάφονται πορτοκαλί, ενώ οι πυρήνες των λείων μυϊκών κυττάρων μαύροι. Ο κυματισμός των πετάλων της ελαστίνης είναι εμφανής στις εικόνες α και β, αλλά σταδιακά ελαττώνεται με την αύξηση της τάσης στην εικόνα γ. Στην εικόνα δ, παρατηρούνται μόνο ευθειασμένα πέταλα, τα οποία φαίνονται συμπυκνωμένα στην εικόνα ε (Verhoeff's elastica, $\times 20$).



Εικόνα 2. Περιφερειακές τομές του αορτικού τοιχώματος, που υποβάλλεται κατά τη μονιμοποίησή του στα επίπεδα τάσης της εικόνας 1. Η προοδευτική εφαρμογή τάσης δεν έχει αποτέλεσμα στην κατανομή στο χώρο και στον κυματισμό των πετάλων της ελαστίνης (Verhoeff's elastica, $\times 20$).



Εικόνα 3. Επιμήκεις τομές του αορτικού τοιχώματος, που μονιμοποιήθηκε υπό τα επίπεδα τάσης της εικόνας 1. Οι ίνες του κολλαγόνου βάφτηκαν ερυθρές και οι πυρήνες των λείων μυϊκών κυττάρων μαύροι. Η πύκνωση των ινών του κολλαγόνου είναι μέγιστη στις εικόνες α και β, ενώ παραμένει αμετάβλητη στην εικόνα γ, ωστόσο οι ίνες του κολλαγόνου προοδευτικά αναπροσανατολίζονται κατά τον επιμήκη άξονα με την αύξηση της τάσης. Στην εικόνα δ, μεγάλο μέρος των αναπροσανατολισμένων ινών ευθείαζεται στην περιοχή του μέσου χιτώνα εγγύς στον έξω χιτώνα και, τέλος, στην εικόνα ε παρατηρούνται μόνο ευθειασμένες ίνες σε όλο το πάχος του μέσου χιτώνα (Sirius red, $\times 20$).



Εικόνα 4. Περιφερειακές τομές του αορτικού τοιχώματος, που μονιμοποιήθηκε υπό τα επίπεδα τάσης της εικόνας 1. Η διεύθετση και η διάταξη των περιφερειακά προσανατολισμένων δεσμίδων του κολλαγόνου παραμένει αμετάβλητη σε όλα τα επίπεδα της επιμήκως εφαρμοζόμενης τάσης (Sirius red, $\times 20$).

σανατολισμού των κολλαγόνων ινών. Στις εγκάρσιες τομές, το κολλαγόνο εμφανίζεται με τη μορφή μακρών κυματοειδών δεσμίδων με προσανατολισμό πρωτίστως κατά τον περιφερειακό άξονα, καθώς επίσης και με τη μορφή βραχείων πτυχωμένων ινών χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό. Η διαμόρφωση αυτή του κολλαγόνου δεν μεταβλήθηκε μετά από τη μηχανική προετοιμασία, όπως συνέβη αντίστοιχα με το δίκτυο των ελαστικών ινών. Η εφαρμογή προοδευτικά αυξανόμενων τάσεων είχε ως αποτέλεσμα τον αναπροσανατολισμό ενός αριθμού ινών του κολλαγόνου κατά τη διεύθυνση της τάσης, καθώς και τον ευθαιασμό και τη σύμπτυξή τους σε επάλληλες σειρές (εικ. 3). Οι αλλαγές στη διαμόρφωσή τους ακολουθούν εκείνες της ελαστικής σε άμεση συνάρτηση με το επίπεδο της τάσης που ασκήθηκε.

Με την άσκηση χαμηλών τάσεων, το σύνολο των κολλαγόνων ινών παρέμεινε πτυχωμένο, αλλά έδειχνε περισσότερο προσανατολισμένο κατά τον άξονα της τάσης συγκριτικά με το επίπεδο μηδενικής τάσης. Σε επίπεδα φυσιολογικών τάσεων, οι ίνες του κολλαγόνου συνέχιζαν να αναπροσανατολίζονται και ορισμένες άρχιζαν να αποσυσπειρώνονται, ενώ με το τέλος της άσκησης των φυσιολογικών τάσεων ένα μεγαλύτερο ποσοστό ινών είχε προσανατολιστεί κατά τον άξονα της τάσης και ορισμένες από αυτές είχαν πλήρως ευθαιαστεί. Καθώς το αορτικό τοίχωμα υποβαλλόταν σε υψηλά επίπεδα τάσεων, περισσότερες ίνες αποσυσπειρώνονταν και ήταν εμφανής πλέον ο ευθαιασμός μεγάλου αριθμού κολλαγόνων ινών. Στα πολύ υψηλά επίπεδα τάσεων, η πλειονότητα των ινών ήταν σχεδόν ευθαιασμένες και συμπυκνωμένες μεταξύ τους, ενώ οι μεμονωμένες ίνες εμφανίζονταν να έχουν μεγαλύτερο μήκος συγκριτικά με την πτυχωμένη διάταξή τους σε δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε τάση. Οι αλλαγές της μικροδομής του αγγείου δεν ήταν όμοιες σε όλο το πάχος του μέσου χιτώνα, με τις μεταβολές της έξω στιβάδας να προηγούνται εκείνων των εσωτερικών στιβάδων. Επίσης, η προοδευτική εφαρμογή τάσης κατά τον επιμήκη άξονα δεν είχε επίδραση στις περιφερειακά διευθετημένες δεσμίδες του κολλαγόνου (εικ. 4).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η περιγραφή των μεταβολών που επέρχονται στην ιστολογική μικροδομή του αορτικού τοιχώματος υπό την επίδραση διαφόρων επιπέδων μηχανικής τάσης. Τα ιστολογικά ευρήματα υποδηλώνουν ότι το δίκτυο ινών της ελαστικής και του κολλαγόνου δρα διαφορετικά σε χαμηλές, φυσιολογικές και υψηλές τάσεις. Οι χαμηλές τάσεις προ-

κάλεσαν τον ευθαιασμό των ελαστικών πετάλων, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στις φυσιολογικές τάσεις, με συνακόλουθη επιμήκυνση των ήδη ευθαιασμένων πετάλων. Οι υψηλές τάσεις είχαν ως συνέπεια την υπερέκταση και τη σύμπτυξή τους. Οι ίνες του κολλαγόνου αναπροσανατολίζονταν σε χαμηλά επίπεδα τάσης, σε φυσιολογικά επίπεδα ευθαιάζονταν, ενώ σε υψηλά επίπεδα συνέχισαν να ευθαιάζονται μαζικά και παράλληλα να συμπύσσονται.

Σχολιασμός των ιστολογικών ευρημάτων

Τα ευρήματά μας που αφορούν σε χαμηλές και φυσιολογικές τάσεις βρίσκονται σε αντιστοιχία με τις ιστολογικές παρατηρήσεις των Glagov και Wolinsky^{3,12} και των Clark και Glagov^{5,6} σε μελέτες στην αορτή του κουνελιού που ήταν μονιμοποιημένη σε πιέσεις μεταξύ 0–200 mmHg. Οι συγγραφείς αυτοί βρήκαν ότι τα πέταλα της ελαστικής ήταν ευθαιασμένα σε πιέσεις μεγαλύτερες της διαστολικής, ενώ το κολλαγόνο, μολονότι ήταν τυχαία διευθετημένο και πτυχωμένο σε χαμηλές πιέσεις, προσανατολιζόταν περιφερειακά αλλά παρέμενε πτυχωμένο σε υψηλότερες πιέσεις. Παρεμφερείς παρατηρήσεις όσον αφορά στην ελαστική ανακοινώθηκαν πρόσφατα από τον Dobrin,¹⁶ ο οποίος ανέφερε ότι σε ιστολογικές τομές καρωτίδας τα πέταλα της ελαστικής ήταν σχεδόν ευθαιασμένα και έφεραν τις τάσεις που αναπτύσσονταν στο τοίχωμα του αγγείου σε πιέσεις κάτω από τη διαστολική.

Τα ευρήματά μας σχετικά με τον προσανατολισμό του κολλαγόνου συμφωνούν επίσης με εκείνα των Roveri et al,¹⁷ όπου χρησιμοποιήθηκε διάθλαση με ακτίνες x για να μελετηθεί ο προσανατολισμός του κολλαγόνου υπό μονοαξονικό εφελκυσμό στη θωρακική αορτή. Οι εν λόγω ερευνητές παρατήρησαν, εστιάζοντας τη μελέτη τους στο μοριακό προσανατολισμό και όχι στον προσανατολισμό των ινών, ότι τα μόρια του κολλαγόνου αναπροσανατολίζονταν κατά τη διεύθυνση της τάσης ακόμη και σε πολύ μικρές τάσεις, με τον αριθμό τους να αυξάνεται σε υψηλότερα επίπεδα τάσης. Τα ευρήματά μας επίσης επεκτείνουν εκείνα των Samila και Carter,¹⁸ οι οποίοι υπολόγισαν το βαθμό πτύκωσης των ελαστικών πετάλων και των κολλαγόνων ινών στην καρωτίδα του ανθρώπου. Οι ερευνητές αυτοί χρησιμοποίησαν, όπως και εμείς, αορτικές λωρίδες που υποβλήθηκαν σε άλλοτε άλλου βαθμού εφελκυστική τάση και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν για την ανάδειξη της ελαστικής και του κολλαγόνου, αλλά, αντίθετα με την παρούσα εργασία, οι λωρίδες ήταν περιφερειακά προσανατολισμένες, δεν είχαν υποβληθεί σε μηχανική προ-

ετοιμασία και η πύκνωση μελετήθηκε μόνο κατά τον περιφερειακό άξονα υπό φυσιολογικές τάσεις. Παρατηρήθηκαν ελάχιστες μεταβολές στην πύκνωση των ινών του κολλαγόνου σε όλο το φάσμα των τάσεων που εξετάστηκαν, καθώς και ταχεία εκδίπλωση των πετάλων, με ελάχιστες αλλαγές να επισυμβαίνουν μετά από την εφαρμογή χαμηλών τάσεων.

Αντίθετα προς τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, οι μελέτες που προαναφέρθηκαν διερεύνησαν τις μικροδομικές αλλαγές των αιμοφόρων αγγείων μόνο κατά τον περιφερειακό άξονα. Απ' όσα γνωρίζουμε, δεν έχει εξεταστεί κατά το παρελθόν η επίδραση της επιμήκως εφαρμοζόμενης φόρτισης, η οποία επιτρέπει τη δομική επεξήγηση της μηχανικής απόκρισης του αορτικού τοιχώματος κατά τον επιμήκη άξονα. Το πλέον σημαντικό, όμως, πλεονέκτημα της παρούσας εργασίας έναντι των προηγούμενων είναι ότι το φάσμα των τάσεων που μελετήθηκε δεν περιοριζόταν στα πλαίσια των φυσιολογικών τιμών, αλλά συμπεριελάμβανε από μηδενικές έως πολύ υψηλές τάσεις, κοντά στο σημείο ρήξης του αορτικού ιστού. Ως γνωστό, σε ορισμένες καταστάσεις, όπως τα τροχαία ατυχήματα, η τοποθέτηση ενδοαορτικών μοσχευμάτων κ.ά., η αορτή υφίσταται εξαιρετικά υψηλές τάσεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε αστοχία και ρήξη του ιστού. Τα παρόντα ευρήματα που αφορούν στη διάταξη των ινών της ελαστίνης και του κολλαγόνου σε υψηλές τάσεις κρίνονται, επομένως, ως απαραίτητα για την κατανόηση των μηχανισμών αστοχίας και ρήξης του αορτικού ιστού.

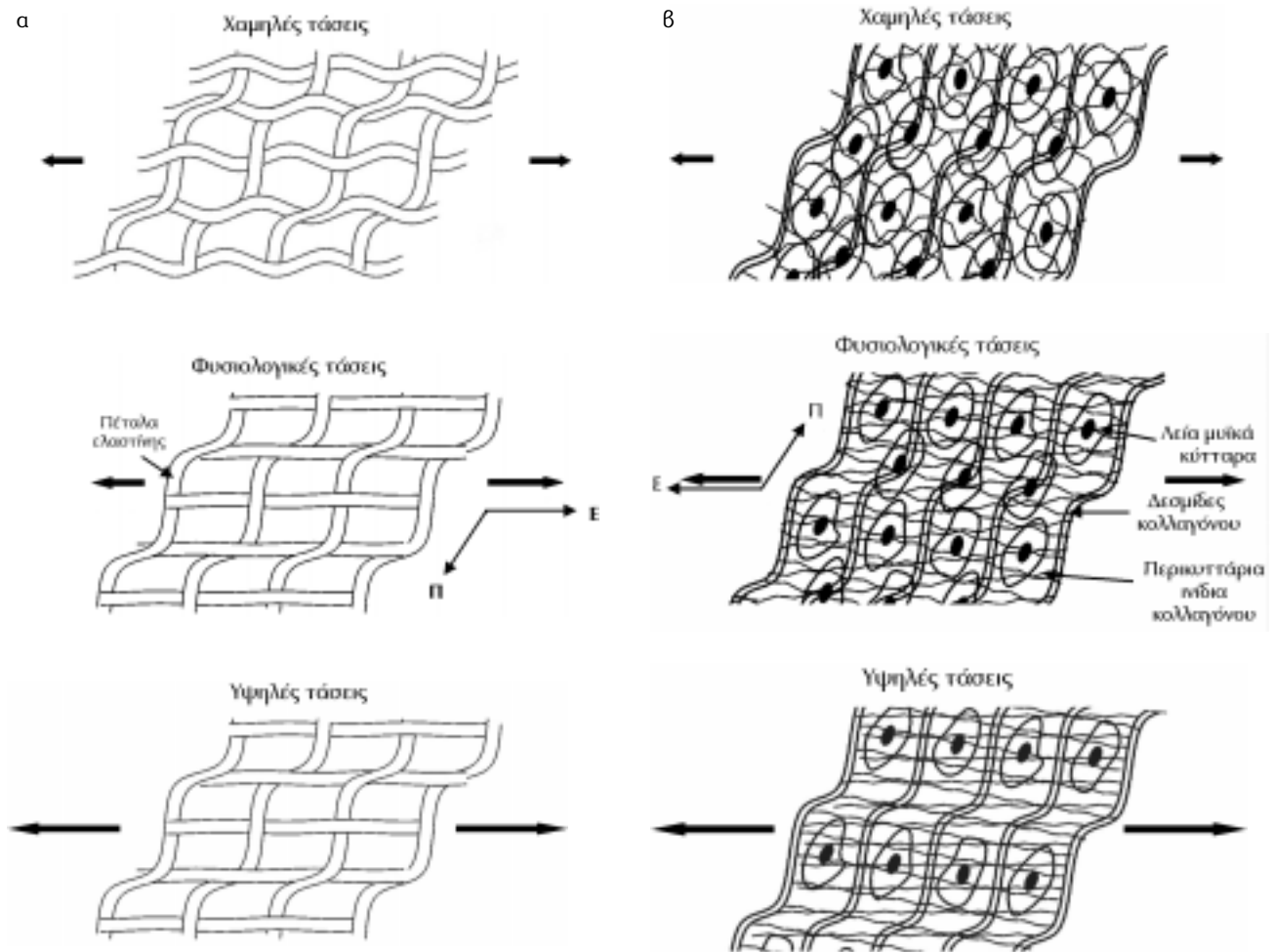
Δομικό πρότυπο του αορτικού τοιχώματος

Στις εικόνες 2 και 4 παρατηρείται, αντίστοιχα, ότι η μηχανική τάση δεν είχε επίδραση στα πέταλα της ελαστίνης και στις δεσμίδες του κολλαγόνου που ήταν διατεταγμένες κατά τον περιφερειακό άξονα. Ωστόσο, γνωρίζοντας ότι τα πέταλα της ελαστίνης παρουσιάζουν μορφή επάλληλων στιβάδων τουλάχιστον στο έσω τμήμα του μέσου χιτώνα,^{8,9} θα αναμενόταν παραμόρφωσή τους σε όλες τις διευθύνσεις κατά το μονοαξονικό εφελκυσμό. Το γεγονός ότι εμφανίζονταν ανεπηρέαστα από τις τάσεις στις εγκάρσιες τομές καταδεικνύει (α) ότι ήταν ινώδους υφής και (β) ότι οι ίνες που ήταν διατεταγμένες κάθετα στον άξονα της τάσης δεν ήταν προσκολλημένες σε εκείνες που διατάσσονταν σε άλλες διευθύνσεις (εικ. 5). Η ινώδης υφή των πετάλων της ελαστίνης υπό τάση μπορεί να επεξηγηθεί σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης,^{10,27} που επισήμαναν ότι τα πέταλα της ελαστίνης υφίστανται μεταβολή στη δομή τους, ακόμη και όταν

υποβάλλονται σε χαμηλές τάσεις, από μια μεμβρανώδη σε μια ινώδη μορφή.

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 4, η πύκνωση των περιφερειακά προσανατολισμένων δεσμίδων του κολλαγόνου δεν μεταβλήθηκε προΐουσας της ασκούμενης τάσης, γεγονός αναμενόμενο εάν ληφθεί υπόψη το δομικό πρότυπο του αορτικού τοιχώματος που έχει προταθεί στις ιστολογικές μελέτες των Clark και Glasgow.^{5,6} Οι εν λόγω ερευνητές εξέτασαν τη μικροδομή του αορτικού τοιχώματος, έχοντας συνδέσει το αγγείο με *in situ* πειραματική διάταξη τεχνητής κυκλοφορίας, κατά τη διάρκεια της οποίας οι τάσεις που ασκούνταν κατά τον περιφερειακό και επιμήκη άξονα ήταν παρεμφερείς και εντός των φυσιολογικών ορίων. Οι εργασίες τους παρέιχαν απόδειξη για την ύπαρξη δύο διαφορετικών ομάδων κολλαγόνου, μιας με τη μορφή δεσμίδων κυρίως με περιφερειακό προσανατολισμό και μιας άλλης με τη μορφή ενός περικυττάριου δικτύου από διαπλεκόμενα ινίδια. Η διακριτή διάταξη των δύο ομάδων κολλαγόνου σημειώνεται και στις τομές του αορτικού τοιχώματος υπό μηδενική τάση, των εικόνων 3α και 4α. Επειδή τα αορτικά δείγματα υποβλήθηκαν αποκλειστικά σε μονοαξονικό εφελκυσμό, η επίδραση των ινών με προσανατολισμό εκτός του άξονα της τάσης αναμενόταν να είναι περιορισμένη, ενώ οι ίνες που διατάσσονταν κάθετα προς τη διεύθυνση της τάσης δεν αναμενόταν να φέρουν τα φορτία, εκτός και αν ήταν συζευγμένες με τις υπόλοιπες. Αυτό ακριβώς συνέβαινε με τα διαπλεκόμενα ινίδια του περικυττάριου πλέγματος, τα οποία, υπό την επίδραση της επιμήκως εφαρμοσθείσας τάσης, ευθειάστηκαν τόσο κατά τον επιμήκη όσο και κατά τον ακτινικό άξονα, ενώ δεν συνέβη το ίδιο με τις παχύτερες δεσμίδες του κολλαγόνου, που διατήρησαν τον περιφερειακό προσανατολισμό τους καθώς επίσης και την πτυχωμένη εμφάνισή τους (εικ. 5).

Συνοψίζοντας, η ιστολογική μελέτη των μεταβολών της αορτικής μικροδομής κατά το μονοαξονικό εφελκυσμό, που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, κατέδειξε ότι σε χαμηλές τάσεις τα πέταλα της ελαστίνης ευθειάζονται και οι δεσμίδες του κολλαγόνου αναπροσανατολίζονται κατά τον άξονα της τάσης, ενώ σε φυσιολογικές τάσεις τα πέταλα της ελαστίνης συνεχίζουν να ευθειάζονται και οι αναπροσανατολισμένες δεσμίδες του κολλαγόνου αρχίζουν να κάνουν το ίδιο. Σε υψηλές τάσεις, τα πέταλα της ελαστίνης είναι ευθειασμένα και συμπυκνωμένα, ενώ οι δεσμίδες του κολλαγόνου συνεχίζουν να ευθειάζονται. Διαπιστώνεται, λοιπόν, συσχέτιση των ιστολογικών αναδιατάξεων του αορτικού τοιχώματος με το επίπεδο της εφαρμοζόμενης τάσης και επεξηγείται ο μηχανισμός με τον οποίο η μικροδομή της αορ-



Εικόνα 5. Σχηματικό πρότυπο του δικτύου ινών της ελαστίνης (α) και του κολλαγόνου (β) της αορτής που υποβάλλεται σε χαμηλές, φυσιολογικές και υψηλές τάσεις κατά τον επιμήκη άξονά της. Το Π υποδηλώνει τον περιφερειακό και το E τον επιμήκη άξονα. Τα παχυσμένα βέλη καταδεικνύουν την εφαρμογή τάσης. Υπό χαμηλές τάσεις, τα πέταλα της ελαστίνης είναι κυματοειδή και προσανατολισμένα σε αμφοτερές τις διευθύνσεις, οι κυματοειδείς δεσμίδες του κολλαγόνου διατάσσονται περιφερειακά και οι περικυττάρια ίνες του κολλαγόνου κατανέμονται εξίσου, δηλαδή στις 45°, ως προς τους δύο άξονες. Υπό φυσιολογικές και υψηλές τάσεις, τα πέταλα της ελαστίνης ευθειάζονται κατά τον επιμήκη άξονα, οι περιφερειακά διευθετημένες δεσμίδες του κολλαγόνου μένουν αμετάβλητες, ενώ οι περικυττάρια ίνες αναπροσανατολίζονται κατά τον επιμήκη άξονα και αρχίζουν να ευθειάζονται.

τής ανταποκρίνεται στις μεταβολές των ενδοαυλικών πιέσεων. Σε χαμηλές ενδοαυλικές πιέσεις, οι τάσεις που αναπτύσσονται στο αορτικό τοίχωμα φέρονται από την ελαστίνη, σε υψηλές πιέσεις από το κολλαγόνο και σε φυσιολογικές πιέσεις τόσο από την ελαστίνη όσο και από το κολλαγόνο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς ευχαριστούν την τεχνικό κυρία Α. Αγαπάκη για τη βοήθειά της στη διεξαγωγή των ιστολογικών χρώσεων.

ABSTRACT

Histological changes of the aortic wall under mechanical stressE.M. KEFALOYANNIS,¹ D.P. SOKOLIS,² M. KOULOUKOUSSA,¹ E. MARINOS,¹ H. BOUDOULAS,²
P.E. KARAYANNACOS²¹Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, ²Center for Experimental Surgery, Foundation of Biomedical Research, Academy of Athens, Athens, Greece
Archives of Hellenic Medicine 2007, 24(3):291-300

OBJECTIVE It is known that the aorta responds to changes in intraluminal pressures by changes in its dimensions. The aim of this study was the investigation of the structural-histological remodeling of the aortic wall as a result of the action of different levels of mechanical stress. **METHOD** Thirty-five white male New Zealand rabbits of the same age were used. The descending thoracic aorta was removed following median sternotomy and longitudinal strips were obtained, which were subjected to pre-selected levels of mechanical stress on a uniaxial tensile-testing device. Specimens were fixed under various levels of stress in Karnovsky's solution, dehydrated, and embedded in paraffin. The procedure was repeated at different levels of stress that covered the entire range of stresses potentially applied to the vessel wall, from zero to very high levels. The orientation of elastin and collagen fibers in the tunica media was examined in transverse and longitudinal sections of the vessel. For light microscopy examination, specimens were stained with Verhoeff's elastica for identification of elastin and with Sirius red for identification of collagen. **RESULTS** The elastic lamellae under zero stress were wavy and distributed along both the longitudinal and circumferential directions of the vessel, whereas collagen was coiled and appeared in the form of bundles with precise circumferential orientation and in the form of interlaced fibrils. In longitudinal sections, the elastic lamellae gradually unfolded at low and were almost straight at physiologic and high stresses, while collagen fibrils reoriented in the longitudinal axis at low, started uncoiling at physiologic, and straightened massively at high stresses. In transverse sections, the waviness of elastic lamellae and circumferentially distributed collagen bundles remained invariant with increasing longitudinally applied stress. **CONCLUSIONS** These microstructural changes indicate that elastin is activated at low and physiologic, and collagen at physiologic and high stresses. A correlation is confirmed between the histological remodeling of the aortic wall and the level of applied stress, and an explanation is provided for the mechanism by which the histological microstructure of the aorta responds to changes in intraluminal pressures.

Key words: Aorta, Elastin, Collagen, Mechanical stress**Βιβλιογραφία**

- BOUDOULAS H, WOOLEY CF. Aortic function. In: Boudoulas H, Toutouzas PK, Wooley CF (eds) *Functional abnormalities of the aorta*. Futura Publ Co Inc, New York, 1996:3-36
- NICHOLS WW, O'ROURKE MF. *McDonald's blood flow in arteries. Theoretical, experimental and clinical principles*. 3rd ed. Oxford University Press, New York, 1990:77-114, 216-266, 283-374
- WOLINSKY H, GLAGOV S. Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media. *Circ Res* 1964, 14:400-413
- WOLINSKY H, GLAGOV S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res* 1967, 20:99-111
- CLARK JM, GLAGOV S. Structural integration of the arterial wall. I. Relationships and attachments of medial smooth muscle cells in normally distended and hyperdistended aortas. *Lab Invest* 1979, 40:587-602
- CLARK JM, GLAGOV S. Transmural organization of the arterial media. *Arteriosclerosis* 1985, 5:19-34
- ROACH MR. The pattern of elastin in the aorta and large arteries of mammals. In: Nugent J, O'Connor M (eds) *Development of the vascular system*. Ciba Found Symp 100, Pitman, London, 1983:36-55
- SONG SH, ROACH MR. Quantitative changes in the size of fenestrations of the elastic laminae of sheep thoracic aorta studied with SEM. *Blood Vessels* 1983, 20:145-153
- SONG SH, ROACH MR. A morphological comparison of aortic elastin from five species as seen with the scanning electron microscope. *Acta Anat (Basel)* 1985, 123:45-50
- ROACH MR, SONG SH. Arterial elastin as seen with scanning electron microscopy: A review. *Scanning Microsc* 1988, 2:994-1004
- ROACH MR, BURTON AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem* 1957, 35:681-690

12. GLAGOV S, WOLINSKY H. Aortic wall as a "two-phase" material. *Nature* 1963, 199:609–611
13. COX RH. Passive mechanics and connective tissue composition of canine arteries. *Am J Physiol* 1978, 234:H533–H541
14. DOBRIN PB, ROVICK AA. Influence of vascular smooth muscle on contractile mechanics and elasticity of arteries. *Am J Physiol* 1969, 217:1644–1651
15. COX RH. Mechanics of canine iliac artery smooth muscle *in vitro*. *Am J Physiol* 1976, 230:462–470
16. DOBRIN PB. Distribution of lamellar deformations: Implications for properties of the arterial media. *Hypertension* 1999, 33:806–810
17. ROVERI N, RIPAMONTI A, PULGA C, JERONIMIDIS G, PURSLOW PP, VOLPIN D ET AL. Mechanical behaviour of aortic tissue as a function of collagen orientation. *Makromol Chem* 1980, 181:1999–2007
18. SAMILA ZJ, CARTER SA. The effect of age on the unfolding of elastin lamellae and collagen fibers with stretch in human carotid arteries. *Can J Physiol Pharmacol* 1981, 59:1050–1057
19. SOKOLIS DP, BOUDOULAS H, KARAYANNACOS PE. Assessment of the aortic stress-strain relation in uniaxial tension. *J Biomech* 2002, 35:1213–1223
20. SOKOLIS DP, ZARBIS N, DOSIOS T, PAPALOUKA V, PAPADIMITRIOY L, BOUDOULAS H ET AL. Post-vagotomy mechanical characteristics and structure of the thoracic aortic wall. *Ann Biomed Eng* 2005, 33:1–13
21. ANGOURAS D, SOKOLIS DP, DOSIOS T, KOSTOMITSOPOULOS N, BOUDOULAS H, SKALKEAS G ET AL. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000, 17:468–473
22. BERGEL DH. Static elastic properties of the arterial wall. *J Physiol Lond* 1961, 156:445–457
23. FUNG YC. Elasticity of soft tissues in simple elongation. *Am J Physiol* 1967, 213:1532–1544
24. FUNG YC. Biorheology of soft tissues. *Biorheology* 1973, 10:139–155
25. FUNG YC. Description of internal deformation and forces. In: Fung YC (ed) *Biomechanics: Motion, flow, stress and growth*. Springer-Verlag, New York, 1990:353–381
26. HUMPHREY JD. Cardiovascular solid mechanics: Cells, tissues, and organs. 1st ed. Springer-Verlag, New York, 2002:68–105, 249–357
27. SHEREBRIN MH, SONG SH, ROACH MR. Mechanical anisotropy of purified elastin from the thoracic aorta of dog and sheep. *Can J Physiol Pharmacol* 1983, 61:539–545

Corresponding author:

E. Kefaloyannis, 10 Plateon street, GR-151 24 Amaroussio, Greece
e-mail: doctor_m@hol.gr