

Н. А. Юзефович, М. Ю. Бойко, Н. И. Русак,
И. А. Мельников, Т. М. Студеникина

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В СРЕДНЕЙ ОБОЛОЧКЕ СТЕНКИ АОРТЫ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Проведен морфометрический анализ гладкомышечных клеток в средней оболочке стенки брюшного отдела аорты человека в норме в возрастных группах с 1 года до 70 лет у лиц мужского и женского пола. Проанализировано количество гладкомышечных клеток у мужчин и женщин в разных возрастных группах. Установлен характер изменений этих показателей у мужчин и женщин с возрастом. Проведена кариометрия гладкомышечных клеток на гистологических срезах аорты и в препаратах изолированных гладкомышечных клеток. Изучены такие количественные характеристики как диаметр поперечного сечения ядер, их логарифм площади, фактор формы и элонгация. Анализ показателя диаметра поперечного сечения ядер гладкомышечных клеток позволил составить представление об активности протекающих в клетках синтетических процессов. Полученные количественные характеристики на изолированных клетках позволили предположить наличие гладкомышечных клеток двух фенотипов (сократительного и синтетического).

Ключевые слова: морфометрический анализ, гладкомышечные клетки, аорта.

**N. A. Yuzefovich, M. Y. Boiko, N. I. Rusak,
I. A. Melnikov, T. M. Studenikina**

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE AORTIC MEDIA

The morphometric analysis of the smooth muscle cells of the abdominal part of an aortic media in normal in age groups from 1 to 70 years at men and women was carried out. The quantity of the smooth muscle cells at men and women in different age groups was analyzed. The nature of changes of these indicators at men and women with age was established. The morphometric analysis of the nuclei of smooth muscle cells on histologic cuts of an aorta and separated cells was carried out. Such quantitative characteristics as diameter of cross section of nuclei, their logarithm of the area, factor of a form and elongation was studied. The analysis of diameter of cross section of the smooth muscle cells nuclei allowed to make idea of activity of the synthetic processes in cells. The received quantitative characteristics on the separated smooth muscle cells allowed to reveal smooth muscle cells phenotypes.

Keywords: morphometric analysis, smooth muscle cells, aorta.

В стенке аорты выделяют две основные клеточные линии гладких миоцитов: сократительные и синтетические [3, 8]. Сократительные клетки обеспечивают тургор сосудов и механические свойства сосудистой стенки в целом, поддерживают кровяное давление. Гладкомышечные клетки синтетического типа участвуют в синтезе компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Являясь основным источником компонентов экстрацеллюлярного матрикса, гладкомышечные клетки средней оболочки стенки аорты обеспечивают процессы репарации и физиологической адаптации на протяжении всего постнатального онтогенеза [6, 8]. В последние годы все больше внимания уделяется роли гладкомышечных клеток стенки аорты в развитии различных патологических процессов [3, 5]. Гладкие миоциты, образуя гетерогенную клеточную популяцию, обладают высокой степенью пластичности и могут изменять свой фенотип в ответ на различные повреждающие факторы. Однако последние, как и механизмы, вызывающие фенотипическую модуляцию гладкомышечных клеток, остаются неясными. Представляется, что модуляция фенотипа гладкомышечных клеток имеет

решающее значение в развитии многих сосудистых заболеваний [4, 7].

Цель исследования: провести морфометрический анализ гладкомышечных клеток средней оболочки аорты для определения закономерностей их изменения с возрастом и выявления двух фенотипов у мужчин и у женщин.

Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Белорусский государственный медицинский университет». Материалом для исследования послужили гистологические препараты аутопсийного материала стенки брюшного отдела аорты 63 человек мужского и женского пола (27 женщин и 33 мужчин) в возрасте от 1 года до 70 лет, без системных заболеваний соединительной ткани, без установленной в анамнезе патологии сердечно-сосудистой системы, умерших от причин, не связанных с патологией аорты.

Материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина в течение одних суток, после проводки заливали в парафин. Готовили срезы толщиной 3–4 мкм. Срезы

окрашивали гематоксилин-эозином. В каждом случае исследовали 21 поле зрения в средней оболочке аорты. Площадь одного поля зрения составила 9350 мкм², для каждого случая суммарная площадь изученных полей зрения составила 196 350 мкм² (табл. 1).

Таблица 1. Материалы исследования

Возраст, лет	Пол		Количество случаев	Количество полей зрения в группе	Общая площадь полей зрения в группе, мм ²
	мужчины	женщины			
1–10	3	6	9	189	1,8
11–30	6	6	12	252	2,4
31–45	10	5	15	315	2,9
46–55	5	5	10	210	2,0
56–70	9	5	14	294	2,7
Всего	33	27	60	1260	11,8

Для получения изолированных гладкомышечных клеток использовался метод щелочной диссоциации [2], включающий в себя длительную (14–20 суток) фиксацию ткани аорты в 10 % формалине, диссоциацию в 50 % водном растворе КОН в течение 24 часов, гомогенизацию полученного материала, промывку полученной суспензии и нанесение ее на предметное стекло с последующей окраской азур-эозином. В каждом случае измерялось от 120 до 150 гладкомышечных клеток.

Проводился подсчет количества гладкомышечных клеток (на гистологических срезах средней оболочки аорты), а также их морфометрический анализ (на срезах и изолированных). В каждом случае измеряли площадь, периметр, максимальный и минимальный диаметр ядер. Вычислялись логарифм их площади, а также их фактор формы и элонгация [1].

Учитывая, что распределение количественных параметров в большинстве выборок отличалось от нормального, для описательной статистики и выявления достоверности отличий использовались непараметрические методы статистической обработки данных [2]. Данные обрабатывались в программе STATISTICA 10. Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха между 25-м и 75-м процентилями. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни. Для наглядного отображения распределения выборки популяции ядер гладкомышечных клеток мы представили данные в виде гистограмм распределения ядер по поперечному диаметру. Достоверность отличий между ними оценивалась по коэффициенту Колмогорова-Смирнова.

Результаты и обсуждение

Подсчет количества ядер гладкомышечных клеток показал, что этот показатель отличается стабильностью и не изменяется на протяжении всего периода наблюдения (рис. 1). Достоверных отличий между различными возрастными группами выявлено не было (табл. 2). У мужчин среднее количество ядер для всей выборки составило 188 (171–202)

на 0,1 мм², у женщин – 214 (176–240) на той же площади среза. Несмотря на то, что у женщин в большинстве возрастных групп количество ядер превышало аналогичные значения у мужчин, при сравнении количества ядер у мужчин и женщин в одинаковых возрастных группах достоверные отличия отмечались только в возрасте 1–10 лет ($p < 0,05$, табл. 2).

Таблица 2. Количество ядер гладкомышечных клеток на 0,1 мм² средней оболочки стенки аорты у мужчин и у женщин

Возраст, лет	Мужчины		Женщины		Уровень значимости (p)
	Me	25–75 % интерквартильный размах	Me	25–75 % интерквартильный размах	
1–10	193	147–196	231	212–256	0,0282
11–30	199	174–223	234	201–240	>0,05
31–45	191	164–202	224	180–224	>0,05
46–55	183	179–240	169	163–176	>0,05
56–70	187	147–190	212	197–235	>0,05

При микроскопии гистологических срезов брюшного отдела аорты обращает на себя внимание тот факт, что не только в разных возрастных группах, но и в пределах стенки одного сосуда отмечается совершенно различное положение гладкомышечных клеток и их ядер. При сохранении косопродольной ориентации клеток отмечается разнообразие углов наклона ядер, что, вероятно, связано с условиями гемодинамики. Такое расположение ядер гладкомышечных клеток не только затрудняло их измерение, но и приводило к большому разбросу значений площади, периметра, фактора формы в пределах одного среза. В связи с этим оптимальным для получения объективных данных, по нашей оценке, оказался показатель малого (поперечного) диаметра ядер. При любом угле наклона клетки он характеризует изменение диаметра поперечного сечения ядер гладкомышечных клеток, отличаясь наиболее стабильными значениями внутри одного среза, и, таким образом, вероятно, может свидетельствовать об активности протекающих в клетках синтетических процессов.

Диаметр поперечного сечения ядер гладкомышечных клеток средней оболочки аорты у мужчин не изменяется с возрастом. В то же время у женщин кривая зависимости данного признака от возраста напоминает параболу (рис. 2). Учитывая характер зависимости, мы проанализировали диаметр поперечного сечения ядер гладкомышечных клеток в 5 возрастных группах у мужчин и женщин (рис. 3).

У мужчин медианные значения диаметра ядер варьировали в небольших пределах, достоверных статистических отличий между соседними возрастными группами не отмечалось (табл. 3). В то же время у женщин отмечались отличия в значениях данного показателя: достоверное увеличение диаметра ядер в возрасте старше 11 лет и достоверное снижение значений показателя в возрасте старше 55 лет (табл. 4). Данные возрастные периоды связаны с максималь-

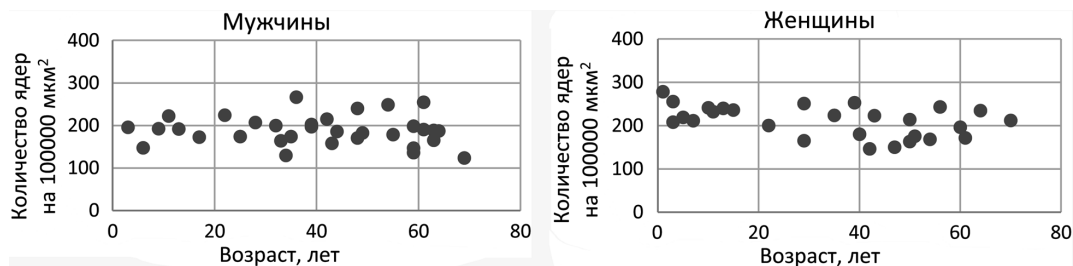


Рисунок 1. Количество ядер гладкомышечных клеток на 0,1 мм² среза средней оболочки аорты у мужчин и у женщин

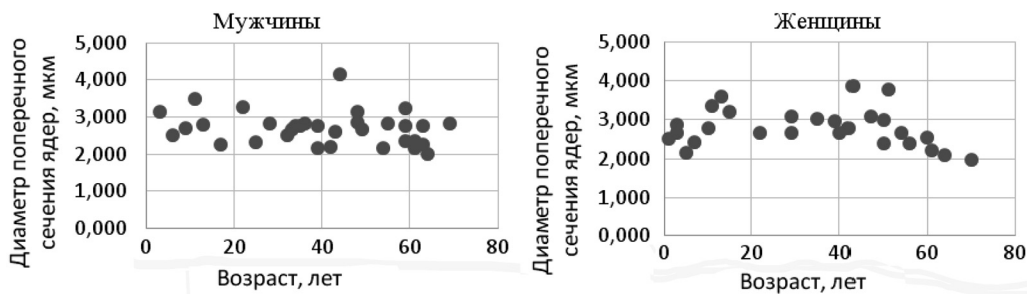


Рисунок 2. Диаметр поперечного сечения ядер гладкомышечных клеток у мужчин и женщин

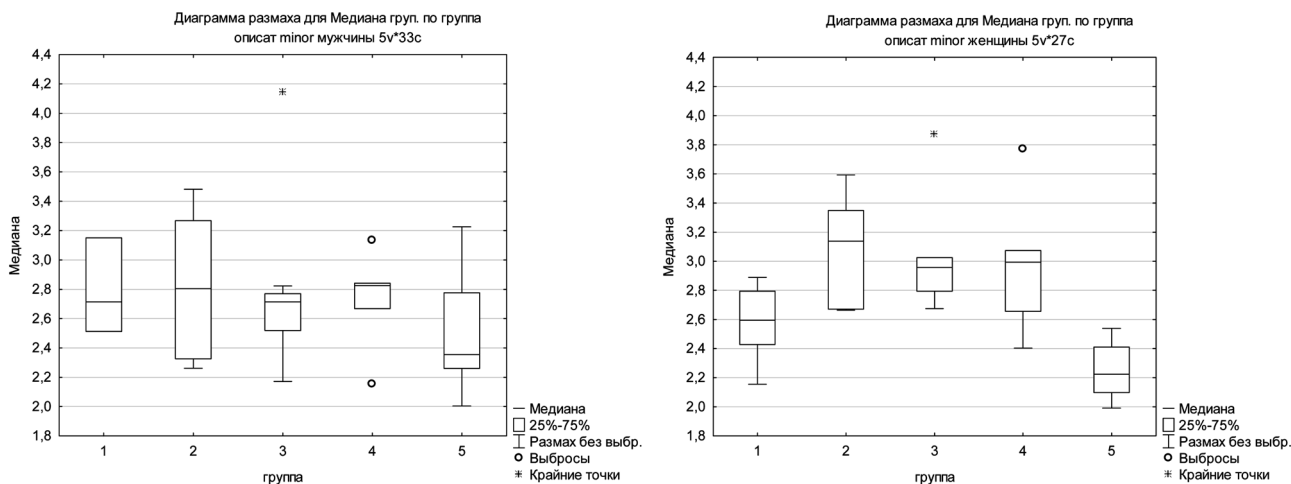


Рисунок 3. Диаграммы размаха значений диаметра поперечного сечения ядер гладкомышечных клеток у мужчин и женщин

Таблица 3. Критерий Манна-Уитни для сравнения соседних возрастных групп у мужчин по диаметру поперечного среза ядер гладкомышечных клеток средней оболочки стенки аорты

	Возрастные группы у мужчин, лет		Статистическая значимость различий
	1–10, Me (25–75 %)	11–30, Me (25–75 %)	
Диаметр поперечного сечения ядер гладких миоцитов, мкм	2,714 (2,512–3,152)	2,804 (2,326–3,268)	Уровень значимости (p)
			>0,05
	2,804 (2,326–3,268)	2,715 (2,519–2,77)	
			>0,05
	2,715 (2,519–2,77)	2,825 (2,669–2,842)	
			>0,05
	2,355 (2,26–2,777)	2,355 (2,26–2,777)	>0,05

Таблица 4. Критерий Манна-Уитни для сравнения соседних возрастных групп у женщин по диаметру поперечного среза ядер гладкомышечных клеток средней оболочки стенки аорты

	Возрастные группы у женщин, лет		Статистическая значимость различий
	1–10, Me (25–75 %)	11–30, Me (25–75 %)	
Диаметр поперечного сечения ядер гладких миоцитов, мкм	2,594 (2,429–2,794)	3,139 (2,671–3,348)	Уровень значимости (p)
			0,0306
	3,139 (2,671–3,348)	2,958 (2,794–3,025)	
			>0,05
	2,958 (2,794–3,025)	2,994 (2,656–3,074)	
			>0,05
		2,224 (2,098–2,411)	2,224 (2,098–2,411)

ными изменениями гормонального фона у женщин и, вероятно, эти колебания могут влиять и на активность синтетических процессов в гладких миоцитах средней оболочки аорты.

Так как при анализе медианных значений поперечного диаметра ядер гладкомышечных клеток существенной возрастной динамика выявлено не было, мы построили гистограммы распределения ядер гладкомышечных клеток по по-

перечному диаметру. Поскольку анализ гистограмм (анализ популяции в целом) является более чувствительным методом, чем анализ средних значений, он помог получить дополнительные данные.

Так, гистограмма распределения ядер гладкомышечных клеток по поперечному диаметру у мужчин в младшей возрастной группе достоверно отличается от соседней (рис. 4,

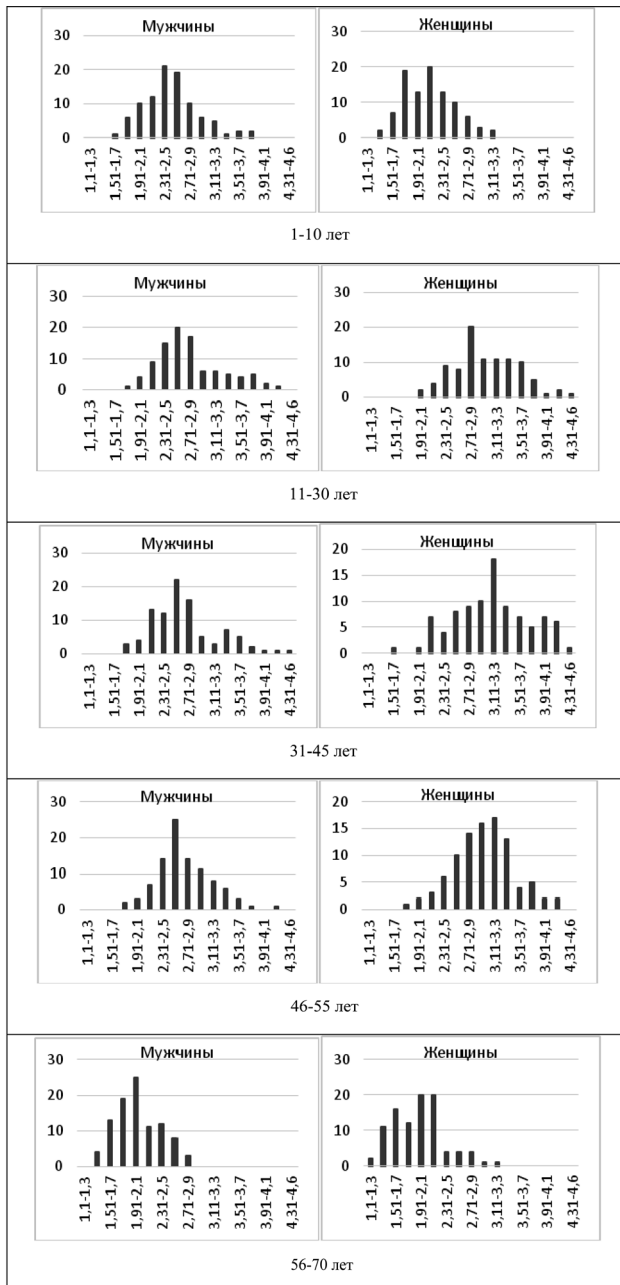


Рисунок 4. Гистограммы распределения ядер гладких миоцитов в средней оболочке аорты по длине поперечного сечения у мужчин и женщин. По оси абсцисс – значения диаметра поперечного сечения ядер гладкомышечных клеток, мкм, по оси ординат – количество ядер

табл. 5). В возрасте от 11 до 55 лет распределение ядер гладкомышечных клеток не изменялось. В старшей возрастной группе гистограмма распределения ядер гладкомышечных клеток по поперечному диаметру вновь достоверно изменяется.

Анализ гистограмм распределения ядер гладкомышечных клеток по поперечному диаметру у женщин подтвердил данные по анализу средних значений (рис. 4, табл. 5) – достоверно отличаются от соседних возрастных групп лишь младшая и старшая группы. Обращает на себя внимание, что достоверные отличия сопровождаются изменением характера гистограмм – наблюдается их двухвершинность. Если предположить, что гладкомышечные клетки сократительного и синтетического типа отличаются интенсивностью про-

Таблица 5. Достоверность различий гистограмм распределения ядер гладких миоцитов в средней оболочке аорты по длине поперечного сечения

Сравниваемые возрастные группы, лет		Значения p для коэффициента Колмогорова-Смирнова	
		мужчины	женщины
1–10	11–30	<0,001	<0,001
11–30	31–45	>0,05	>0,05
31–45	46–55	>0,05	>0,05
46–55	56–70	<0,001	<0,001

текающих в клетке процессов синтеза, и, как следствие, отличаются формой и размерами ядер (более вытянутые и узкие ядра у гладкомышечных клеток сократительного типа, и менее вытянутые и овальные – у гладкомышечных клеток синтетического типа), то подобная двухвершинность показывает активность обеих фенотипических популяций клеток в этих возрастных группах.

Как указывалось выше, микроскопия на обычных гистологических срезах не позволяет определить истинные размеры и форму гладкомышечных клеток и их ядер. Поэтому была поставлена задача провести кариометрию изолированных гладкомышечных клеток, полученных с использованием метода щелочной диссоциации. Но учитывая, что исследование проводилось на здоровой аорте, получить достаточное количество клеточного материала удалось только в старшей возрастной группе (60–70 лет). Стенка здоровой аорты людей младше 60 лет была настолько прочна, что выделить достаточное количество клеток из стенки и получить их в суспензии не удалось. Конгломераты гладкомышечных клеток полученные из стенки аорты мужчин 60–70 лет, содержали связывающие их компоненты экстрацеллюлярного матрикса (рис. 5). Такая связь обеспечивает целостность структуры и высокую механическую прочность.

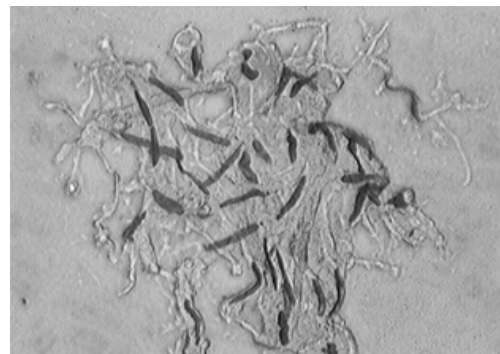


Рисунок 5. Гладкомышечные клетки и их связи в экстрацеллюлярном матриксе

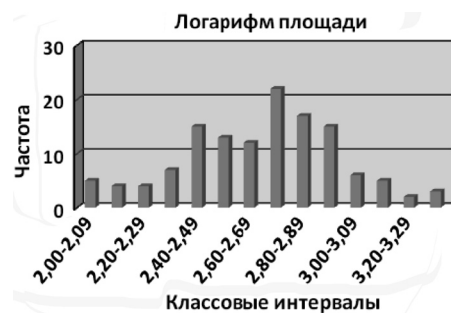


Рисунок 6. Гистограмма распределения ядер гладкомышечных клеток по логарифму площади; по оси абсцисс – логарифма площади, по оси ординат – частота встречаемости значений из этих интервалов

Селективно полученные изолированные гладкомышечные клетки позволили провести кариометрию. Так, медиана логарифма площади ядер составила 2,702 (2,483–2,896), фактора формы – 1,08 (0,892–1,255), элонгации – 4,077 (3,476–4,972), периметра – 20,038 (17,127–22,896), длинного диаметра – 8,799 (7,207–10,295), короткого диаметра – 2,152 (1,898–2,384). При анализе такого традиционно обсуждаемого параметра, как логарифм площади, мы получили на гистограмме две вершины, что подтверждает ранее полученные данные о существовании двух фенотипов гладкомышечных клеток в этом возрастном периоде (рис. 6).

Выводы

1. Количество ядер гладкомышечных клеток в средней оболочке стенки брюшного отдела аорты на протяжении от 1 года до 70 лет и у мужчин, и у женщин остается относительно стабильным. У мужчин среднее количество ядер составляет 188 (171–202) в $0,1 \text{ мм}^2$, у женщин – 214 (176–240) в $0,1 \text{ мм}^2$.

2. Анализ гистограмм распределения ядер гладкомышечных клеток по диаметру поперечного сечения показал достоверное увеличение значений данного параметра у мужчин и у женщин после 11 лет и достоверное снижение значений показателя в возрасте после 55 лет, что может отражать изменение активности происходящих в клетках синтетических процессов. Сами же возрастные рамки совпадают с периодами наибольших изменений гормонального фона.

Оригинальные научные публикации

3. Метод щелочной диссоциации позволяет получить более полную информацию о структуре гладкомышечных клеток. Вместе с тем, его применение для материала здоровой аорты ограничено из-за высокой стабильности структурных компонентов стенки аорты к различным повреждающим факторам.

Литература

1. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Зашихин, А. Л., Агафонов Ю. В., Лисишников Л. В. Способ получения препаратов изолированных клеток. Патент 2104524, РФ. 1998.
3. Archer, S. L. Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells // J. Lab. Clin. Med. – 1996;127:524–529.
4. Assoian, R. K., Marcantonio E. E. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis // J. Clin. Invest. – 1997;100:S15–S18.
5. Hayward, I. P., Bridle K. R., Campbell G. R. et al. Effect of extracellular-matrix proteins on vascular smooth-muscle cell phenotype // Cell. Biol. Int. – 1995;19:839–846.
6. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth-muscle cells // Physiol. Rev. – 1995;75:487–517.
7. Thyberg, J., Hedin U., Sjolund M. et al. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth-muscle cells // Arteriosclerosis. – 1990;10:966–990.
8. Yoshigi, M., Karnik S., Li D. Y., Clark E. B., Yost H. J. Quantitative analysis of cytoskeletal remodeling in vascular smooth muscle cells during phenotypic modulation // Comput Cardiol. – 2000;27:205–206.

Поступила 08.05.2017 г.