

УДК 57.086:[611.126:591.413+616.126.52:591.21]-092.9:599.323.4

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ КАЛЬЦИНОЗЕ

Костюченко В.П., Васильев Д.Н., Герасимов А.В., Денисов А.А.

ГБОУВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2), e-mail: any913@rambler.ru

С помощью световой микроскопии проведен сравнительный морфометрический анализ строения стенки аортального клапана крысы и человека в норме и при кальцинозе. Выявлены морфофункциональные особенности эндотелия, гладких миоцитов, клеток фибробластического ряда, подэндотелиального слоя, процентное соотношение подэндотелиального, мышечно-эластического и спонгиозного слоев, сложная волокнистая архитектура. В эндотелии клапана взрослого человека на аортальной стороне амплификация ядрышек и снижение ядерно-цитоплазматического отношения. У человека подэндотелиальный слой развит хуже, чем у крысы, наблюдается его значительное утолщение при кальцинозе. Общее долевое соотношение мышечно-эластического и спонгиозного слоев у человека составляет 0,1, а у крысы – 1,1, что указывает на избыточное развитие соединительной ткани у человека зрелого возраста, спонгиозный слой в 3 раза толще, при кальцинозе, наоборот, утолщается мышечно-эластический слой. Количество фибробластов у взрослого человека преобладает над фиброцитами, при кальцинозе число фибробластов снижается в 2 раза и число фиброцитов возрастает в 6 раз.

Ключевые слова: аортальный клапан, кальциноз, эндотелиоциты, волокнистая архитектура.

COMPARATIVE HISTOLOGIC RESEARCH OF THE AORTAL VALVE OF THE RAT AND THE PERSON IN NORM AND CALCIFICATION

Kostyuchenko V.P., Vasiliev D.N., Gerasimov A.V., Denisov A.A.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia (634050, Tomsk, street Moskowsky tract, 2), e-mail: any913@rambler.ru

With the help of light-optical microscopic methods, a comparative morphometric analysis of the structure of the wall of the aortic valve rats and humans in health and calcification. Revealed morphological and functional features of the structure of the endothelium, smooth myocytes, cells of fibroblast series potentially layer percentage potentially, musculo-elastic and spongy layers, complex fiber architectonics. In the endothelium of the valve of an adult on the aortic side of the amplification of the nucleoli and a decrease in NCA. At the person the potentially layer is developed worse than at a rat, observed a significant thickening in the calcification. Total Ratio of musculo-elastic and spongy layer in humans is 0.1, and the rat - 1.1, indicating that the development of excessive connective tissue in humans adulthood spongy layer 3 times thicker at the opposite thickened calcification musculo-elastic layer. The number of fibroblasts in the adult dominates fibroblasts, while calcification of the number of fibroblasts decreases in 2 times and the number of fibrocytes is increased in 6 times.

Keywords: aortic valve, calcification, endothelial cells, fibrous architectonics.

За последнее десятилетие многие заболевания сердца сопровождаются кальцинозом [4, 5]. Чаще поражаются аортальные клапаны, что является причиной ранней инвалидизации и смертности. Отложения минеральных солей могут затрагивать все слои клапана, сопровождаться повреждением эндотелия [2], их связывают с изменениями волокнистых структур соединительной ткани [1]. В то же время гистологические особенности при кальцинозе остаются мало изученными. Необходимо комплексное сравнительное исследование волокнистой архитектоники и клеточного состава аортальных клапанов. Интерес представляют клапаны людей зрелого возраста, наиболее продуктивного и актуального для изучения морфологических изменений.

Цель работы в проведении комплексного сравнительного гистологического анализа особенностей строения аортального клапана у крыс и людей зрелого возраста без кальциноза и гистологических изменений при кальцинозе.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили аортальные клапаны 5-месячных половозрелых самцов крыс линии Wistar массой 180–200 гв соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977). Человеческий материал получен при патологоанатомическом вскрытии людей зрелого возраста от 49 до 70 лет, обоих полов. Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Маллори, толуидиновым синим. Материал от больных с кальцинозом декальцинировали в растворе Biodec-R. Весь материал разделили на группы: 1-я контрольная – здоровые половозрелые крысы (5 клапанов); 2-я – люди без кальциноза клапана (16 клапанов); 3-я – люди, имеющие кальциноз (24 клапана). На гистологических срезах производили подсчет количества, размеров, ядерно-цитоплазматического отношения эндотелиоцитов и гладких миоцитов на площади 50 мкм². Измеряли толщину и соотношение подэндотелиального, мышечно-эластического и спонгиозного слоев. Подсчитывали количество фибробластических клеток в спонгиозном слое на площади 50 мкм². Срезы изучали под микроскопом «PrimoStar» («CarlZeiss», Германия) с цифровой фотокамерой G-10 («Canon», Япония) и с программным обеспечением «AxioVision 4.8.2» («CarlZeiss», Германия). Данные морфометрии обрабатывали с использованием пакета прикладных программ «Statistics for Windows» v. 6.I (Statsoft. США). Вычисляли медиану (Me) и интерквартильный интервал (Q1 – Q3). Значимость различий оценивали по U-критерию Манна – Уитни, при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении эндотелия на аортальной стороне оказалось, что количество эндотелиоцитов во 2-й группе значимо не отличается от контроля, но размер больше в 1,5 раза, клетки более высокие и цитоплазма светлая (рис.1). Различия в кариометрических показателях 1-й и 2-ой групп незначимы, и ядерно-цитоплазматическое отношение во второй группе значимо не отличается от контроля, во 2-й группе в эндотелиоцитах наблюдается увеличение числа ядрышек (табл.1), в то время как по данным литературы среднее значение содержания ядрышек в эндотелии человека в норме $1,8 \pm 0,2$ [1].

Таблица 1

Морфометрические показатели клеток на аортальной стороне (Me (Q1 – Q3), $p < 0,05$)

Показатели	1-я группа	2-я группа	3-я группа
N _{Этц}	4,0 (2,0-4,0)	3,0 (2,0-5,0)	3,0 (2,0-4,0)
d _{Этц} , мкм	2,33 (1,76-3,41)	3,87 (3,07-4,76)*	3,75 (3,19-4,45)
L _{Этц} , мкм	9,87 (7,74-15,45)	21,1 (16,1-23,86)*	22 (18,28- 30,4)
S _я , мкм ²	28,8 (5,41-34,42)	22,2 (13,1-32,1)	27,5 (22,0-39,0) **
ЯЦО _{Этц}	0,82 (0,61-1,12)	0,62 (0,54-0,88)	0,72 (0,66-1,31)
N _{Яш}	2,0 (1,0– 2,0)	3,0 (3,0– 4,0)*	2,0 (1,0– 2,0)
N _{Гм}	8,5 (7,0-10,0)	3,0 (2,0-3,0)*	4,0 (3,0-5,0)
d _{Гм} , мкм	2,75 (2,26-3,71)	2,75 (2,04-3,11)	3,32 (2,65-3,46) **
L _{Гм} , мкм	15,6 (13,9-24,9)	32,9 (32,3-36,1)*	30,9 (18,5-41,0)
ЯЦО _{Гм}	1,08 (0,86-1,45)	1,62 (0,66-2,49)	0,87 (0,39-1,45) **
N _{Фбл}	3,0 (1,0-3,0)	2,0 (2,0-3,0)	3,0 (2,4-3,0)
N _{Фц}	8,0 (6,0-15,0)	1,0 (1,0-2,0)*	6,0 (6,0-7,0) **

Примечание. * – значимые различия между 1-й и 2-й группами; ** – значимые различия между 2-й и 3-й группами; N – количество; d – ширина; L – длина; S_я – площадь ядра эндотелиоцитов; ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение; Гм – гладкие миоциты; Фц – фиброциты; Фбл – фибробласты; Этц – эндотелиоциты, Яш – ядрышки.

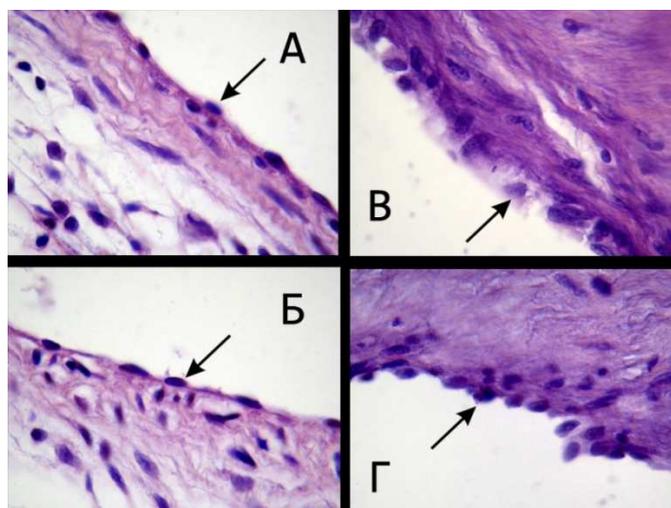


Рис.1. Эндотелий: А – на аортальной стороне клапана крысы; Б – на вентрикулярной стороне клапана крысы; В – на аортальной стороне клапана 2-й группы; Г – на желудочковой стороне клапана 2-й группы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x 1200

Количество эндотелиоцитов на вентрикулярной стороне во 2-й группе меньше, ширина больше в 4,5 раза, ядра клеток крупнее (табл. 2), ядрышки не просматриваются за счет гиперхромии (рис.1).

Таблица 2

Морфометрические показатели эндотелия на вентрикулярной стороне (Me (Q₁ – Q₃), p<0,05)

Показатели	1-я группа	2-я группа	3-я группа
N	4,0 (3,0--5,0)	3,0 (2,0--3,0)*	1,0 (1,0--2,0) **
d, мкм	1,93 (1,5--2,03)	8,73 (7,24--11,2)*	6,5 (6,25--8,22)
L, мкм	15,4 (11,5--18,0)	13,1 (11,3--17,2)	17,9 (16,2--19,5)
S _я	25,3 (17,3--31,2)	35,0 (27,5--43,1)*	48,2 (41,5--64,2)**
ЯЦО	0,74 (0,32--1,43)	0,67 (0,55--0,97)	1,23 (0,97--2,30)**

Примечание. * – значимые различия между 1-й и 2-й группами; ** – значимые различия между 2-й и 3-й группами; N – количество эндотелиоцитов; d – ширина; L – длина; S_я – площадь ядер; ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение.

Подэндотелиальный слой во 2-й группе равномерно утолщен, за счет разрастания коллагеновых волокон и набухания, однако можно говорить о его истончении, если рассматривать толщину субэндотелиального слоя в процентном соотношении с другими слоями (табл. 3).

Таблица 3

Процентное соотношение слоев аортального клапана (Me (Q₁ – Q₃), p<0,05)

Показатели	1-я группа	2-я группа	3-я группа
d _{Подэнд} , мкм	2,85(2,7-3,0)	6,87(5,76-7,77)*	18,9(12,5- 34,9) **
d _{Подэнд} , %	10,4	2,94	7,67
d _{Мыш-элас} , %	57,0	24,4*	55,2**
d _{Спонгиоз} , %	43,0	75,6*	44,8**
d _{Мыш-элас} /d _{Спонгиоз}	1,1 (0,70-5,34)	0,1(0,09-0,14)*	0,78(0,56-0,88) **

Примечание. * – значимые различия между 1-й и 2-й группами; ** – значимые различия между 2-й и 3-й группами; d_{Подэнд} – толщина подэндотелиального слоя; d_{Мыш-элас} – толщина мышечно-эластического слоя; d_{Спонгиоз} – толщина спонгиозного слоя.

В мышечно-эластическом слое морфометрические показатели гладких миоцитов имеют значимые отличия, во 2-й группе слой тоньше в 2,38 раза, гладких миоцитов в 2,5 раза меньше и они длиннее, их ядерно-цитоплазматическое отношение выше в 1,5 раза (табл. 1). Клетки рыхло расположены, неравномерно распределены по количеству и имеют разную ориентацию, в основании створки более плотно располагаются в центре. Отмечается

утолщение эластических мембран, разрастание и уплотнение коллагеновых волокон и единичные очаги набухания основного вещества со слабой метахромазией.

Спонгиозный слой во 2-й группе в 1,76 раза толще (табл. 3). Особенности содержания клеток фибробластического ряда: в 1-й группе фиброцитов больше, чем фибробластов в 2,7 раза, что свидетельствует о зрелости фиброзной ткани и снижении синтетических процессов. Во 2-й группе общее содержание клеток значительно меньше, но фибробласты численно преобладают над фиброцитами (табл.1). Общее доленое соотношение мышечно-эластического и спонгиозного слоев у человека составляет 0,1, а у крысы – 1,1, что указывает на избыточное развитие соединительной ткани у человека зрелого возраста, подтверждается подсчетом фибробластов и особенностями волокнистого строения. Волокнистая архитектура спонгиозного слоя сложная и напоминает «слоёный пирог» (рис. 2).

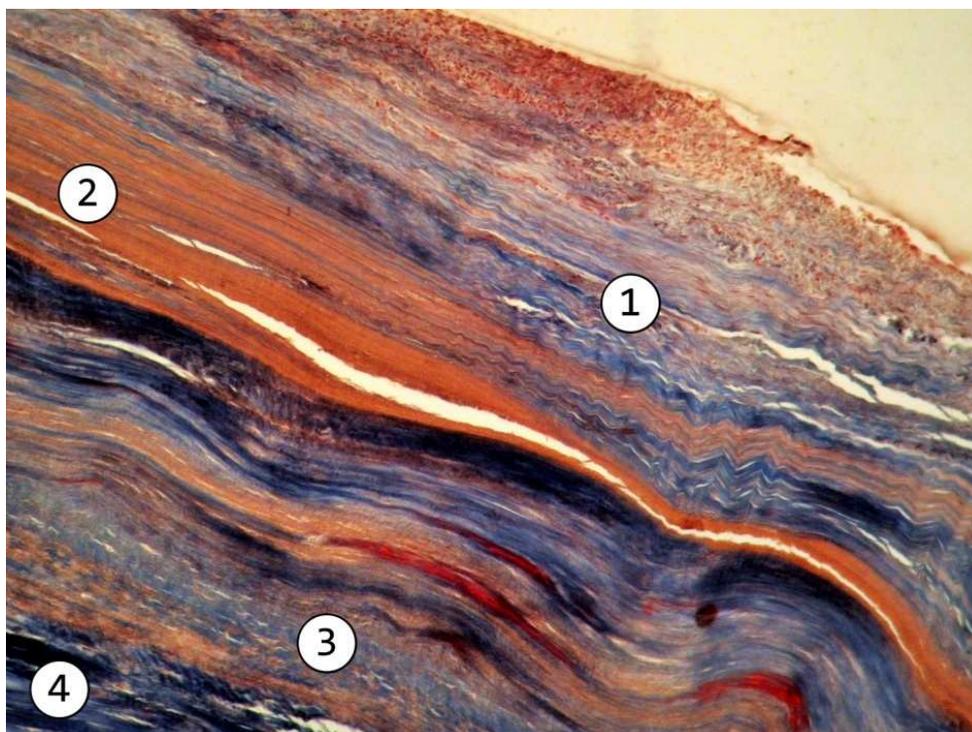


Рис. 2. Волокнистая архитектура спонгиозного слоя. 1 – чередование пучков коллагеновых и эластических волокон по горизонтальной оси в поверхностном слое; 2 – плотное лентообразное скопление эластических волокон; 3 – чередование коллагеновых и эластических волокон по вертикальной оси; 4 – рыхло расположенные коллагеновые волокна.

Окраска по Маллори. Ув. × 600

При кальцинозе происходит повреждение эндотелия, образующего защитный покров створок клапана [4]. На аортальной стороне эндотелий сохранен, но набухший, цитоплазма мутная и межклеточные границы не различимы. Имеет место значительная вариабельность размеров ядер эндотелиоцитов, что говорит о нарушении функциональной активности.

Наблюдается врастание эндотелия в подэндотелиальный слой и сращивание. Подэндотелиальный слой неравномерно утолщен в 2,8 раза за счет разрастания коллагеновых волокон и метахроматично окрашен. На вентрикулярной стороне эндотелий отсутствует, сохранён единичными участками. Клетки уменьшены и удлинены, возрастает их ядерно-цитоплазматическое отношение (табл. 2).

Толщина мышечно-эластического слоя в 3-й группе значимо больше (табл. 3). Наблюдается гиалиноз и немногочисленные треки жировой ткани, расщепление и фрагментация эластических мембран. Наблюдается умеренная пролиферация гладких миоцитов, возрастает их толщина и снижается их ядерно-цитоплазматическое отношение (табл.1). На первое место выступают повреждения эластических волокон, наблюдаются их частичная фрагментация и неравномерное утолщение.

В спонгиозном слое, в наружной его части непосредственно под кальцинатами отек межклеточного вещества, расширенные межфибриллярные пространства, он наиболее богат ГАГ и метахроматически окрашивается (рис.3).

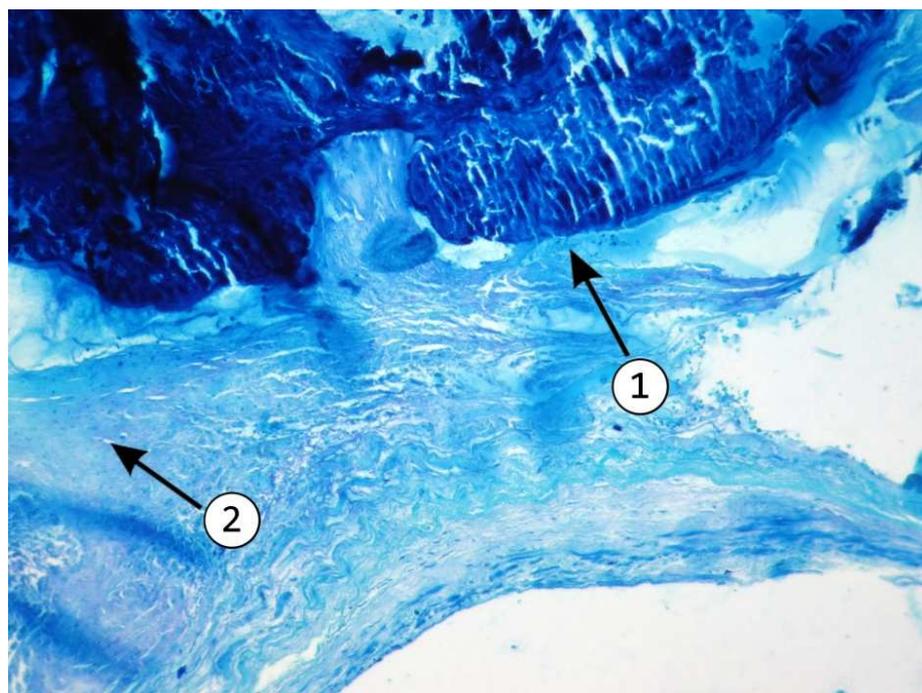


Рис. 3. Стенка аортального клапана человека с кальцинозом. 1 – кальцинаты; 2 – отек и метахромазия межклеточного вещества. Окраска толуидиновым синим. Ув. × 150

Также, в поверхностном слое отмечается разрастание мелких кровеносных сосудов. В средней его части неравномерное утолщение коллагеновых волокон, на отдельных препаратах коллагеновые волокна спаиваются в сплошные ленты, замещаются на толстые, плотные поля коллагеновых волокон. Отмечаются разрушение и неравномерное утолщение эластических волокон. Распределение клеток фибробластического ряда в губчатом слое

неравномерное: в местах отложения минеральных солей их число увеличено в 3 раза преимущественно за счёт фиброцитов, в более глубоких слоях содержание клеток резко уменьшено. Количество фиброцитов в 3-й группе больше чем фибробластов в 2 раза и в 6 раз по сравнению со 2-й группой (табл. 1). На ventрикулярной стороне наблюдаются неравномерные по плотности отложения кальцинатов, они интенсивно окрашиваются пикрофуксином интенсивно метакроматически окрашиваются (рис.3). В кальцинированной ткани отмечается разрастание коллагеновых волокон, они образуют толстые грубые пучки с неупорядоченной ориентацией.

Заключение

Таким образом, настоящее исследование выявило гистологические и цитологические особенности строения оболочек и более сложную волокнистую архитектуру у человека. Выраженные структурные изменения наблюдаются в эндотелии, подэндотелиальном слое и соединительной ткани спонгиозного слоя. В эндотелии аортальной стороны наблюдается амплификация ядрышек во второй группе в сочетании со снижением ядерно-цитоплазматического отношения, что может рассматриваться как компенсаторное напряжение функциональной активности клетки, вероятно, связанное с возрастными изменениями. Подэндотелиальный слой у взрослого человека равномерно утолщен, при кальцинозе его толщина возрастает в 2,8 раз с накоплением ГАГ и разрастанием коллагеновых волокон. Общее доленое соотношение мышечно-эластического и спонгиозного слоев указывает на избыточное развитие соединительной ткани у человека зрелого возраста, это подтверждается морфометрическими показателями фибробластов и особенностями волокнистого строения. При кальцинозе соотношение меняется в сторону значительного утолщения мышечно-эластического и истончения спонгиозного слоёв. При кальцинозе число фиброцитов в 6 раз больше, чем в клапане без кальциноза. В клапане, пораженном кальцинозом, происходит полное повреждение эндотелия на ventрикулярной стороне, а на аортальной стороне набухание и уплотнение эндотелия, полиморфизм размеров ядер с тенденцией к увеличению, разрастание и слущивание эндотелия, утолщение подэндотелиального слоя. При кальцинозе мышечно-эластический слой утолщен, в нем наблюдаются гиалиноз, дистрофические изменения эластических мембран, утолщение гладких миоцитов и снижение их ЯЦО. В спонгиозном слое разрастание коллагеновых волокон. Патологически изменён эндотелий и волокнистый состав на ventрикулярной стороне. В клапанах 3-й группы имеет место сочетание всех трех видов петрификации: а) метастатическое, связанное с общим нарушением фосфорно-кальциевого обмена в организме, б) дистрофическое, связанное с нарушением обмена веществ в гиалинизированной соединительной ткани, а также повышенная чувствительность

эластической ткани и основного вещества к кальцию.

Список литературы

1. Митрофанова Л.Б., Аминова Х.К. Макроскопический и органомертрический анализ сердца в патологии. – СПб., 1998. – 58 с.
2. Шевченко Ю.Л. Эндотелий — структурная основа системы кровообращения: история проблемы // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 9-15.
3. Boudoulas H. Etiology of Valvular Heart Disease in the 21st century / H. Boudoulas // Hellenic J. Cardiol. – 2002. – № 43. – P. 183-188.
4. Lucas G., Tribouilloy C. Epidemiology and etiology of acquired heart valve disease in adults // Rev. Prat. – 2000. – Vol. 50, № 15. – P. 1642-1645.
5. Rose A. G. Etiology of valvular heart disease // Curr. Opin. Cardiol. – 1997. – Vol. 11, № 2. – P. 98-113.

Рецензенты:

Жданкина А.А., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск;

Алябьев Ф.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой судебной медицины с курсом токсикологической химии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск.