

*А.Л.Зашихин, Ю.В.Агафонов, Л.А.Заостровская, А.Л.Черняев, В.П.Быков*

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЛАДКОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ БРОНХОВ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕРАЦИЙ У ЧЕЛОВЕКА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии Архангельской государственной медицинской академии, Архангельск; лаборатория патоморфологии НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

### MORPHOLOGICAL FUNCTIONAL STRUCTURE OF SMOOTH MUSCULAR TISSUE FOR HUMAN BRONCHI OF DIFFERENT GENERATIONS

*A.L.Zashikhin, Yu.V.Agafonov, L.A.Zaostrovskaya, A.L.Cherniayev, V.P.Bykov*

#### Summary

Human bronchial smooth muscular cells isolated by the alkaline dissociation technique were studied. Morphometric indices of myocytes were specified. In addition the contents of both DNU in nuclei and total cytoplasm protein were determined using scanning cytospectrophotometer. Subpopulations of small, mid and large leiomyocytes were also distinguished. It was shown that the mid volume of smooth muscular cells in large, mid and small bronchi differ reliably. With the bronchus diameter to decrease, the share of small myocytes increases and the subpopulation of large myocytes decreases in the structure of the muscular tissue population. Small myocytes are the most dynamic component of the cell's muscular tissue population. Their prevalence is considered relevant to the high adaptation and functional ability of small bronchi.

#### Резюме

Исследовали изолированные методом щелочной диссоциации гладкие мышечные клетки бронхов человека. Определяли морфометрические показатели миоцитов и, с помощью сканирующего цитоспектрофотометра, содержание ДНК в ядрах и общего белка цитоплазмы. Выделены субпопуляции малых, средних и больших лейомиоцитов. Показано, что средний объем гладких мышечных клеток в крупных, средних и мелких бронхах достоверно различается. По мере уменьшения диаметра бронхов в структуре популяции мышечной ткани последовательно возрастает доля малых миоцитов и сокращается субпопуляция больших. Превалирование малых миоцитов как наиболее динамичного компонента клеточной популяции мышечной ткани рассматривается в контексте высокой адаптационно-функциональной способности мелких бронхов.

Гладкая мускулатура является одним из ведущих структурно-функциональных компонентов воздухоносных путей легкого, играющего важную роль как в обеспечении физиологических функций органов дыхания, так и в формировании патогенетических механизмов при различных заболеваниях этой системы [4]. Известно, что бронхи различных генераций различаются по анатомическому строению, соотношению тканевых компонентов и уровню функциональной активности [2,10]. Неоднородный характер контрактильной реакции гладкой мускулатуры бронхов различных генераций описан в ряде работ [5,6]. Исследователями [7,13,11] также приводятся данные о различных механизмах нейромышечной регуляции и уровне реактивности гладкой мышцы при действии антигенных факторов в бронхах различных порядков. Все вышесказанное предполагает существование морфофункционального субстрата, определяющего особенности гладкой мускулатуры бронхов различных генераций. Целью настоящей работы явилось выявление структур-

но-метаболических параметров гладких миоцитов воздухоносных путей легкого и структуры популяции лейомиоцитов в составе стенки бронхов.

Исследован материал 16 пациентов в возрасте 40—60 лет, полученный из интактных участков легких, резецированных по поводу онкологической патологии. Для исключения сопутствующих заболеваний дыхательных путей у пациентов при заборе материала учитывали данные анамнеза. Из полученного материала отбирали 5—6 фрагментов бронхов, которые затем фиксировали при +5°C в растворе 10% формалина на фосфатном буфере при pH 7,4 в течение 14—20 дней. Для идентификации крупных, мелких и средних бронхов использовали морфологические критерии классификации Вейбеля [1]. Бронхи с внутренним диаметром более 5 мм, соответствующие 1—5 порядку по классификации, считали крупными, 6—10 порядка — средними, бронхи 11—15 порядка с внутренним диаметром 2 мм и менее — мелкими. С помощью оригинальной технологии [3] из стенки бронхов выделялась



гладкая мышечная ткань, которая затем обрабатывалась методом щелочной диссоциации. Выявление ДНК в ядрах гладких миоцитов проводили по методу Фельгена в строго идентичных условиях с последующей цитоспектрофотометрией на сканирующем цитофотометре МФТХ-2М при длине волны 546 нм. Контролем служили мазки, не подвергшиеся гидролизу в растворе соляной кислоты. Анализ содержания суммарного белка в цитоплазме проводили при окраске амидо-черным. Препараты сканировали при длине волны 580 нм. Окулярным микрометром измеряли длину и ширину клеток, малый и большой диаметры ядер. Объемы рассчитывали по формуле эллипсоида. Цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики. Вычисляли среднюю арифметическую, дисперсию, коэффициент вариации, показатели асимметрии и эксцесса с их стандартными отклонениями. Обработка результатов проводилась с помощью программы *Statistica*. Степень вероятности отличий ( $p$ ) измеряемых величин определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента при  $p=0,05$ .

Вопрос об изменении клеточной популяции мышечной ткани бронхов при развитии некоторых заболеваний органов дыхания в последние годы рассматривался в ряде работ [8,14,15]. Одной из основных задач настоящего исследования явилось установление четких структурно-метаболических и линейных параметров гладких мышечных клеток бронхов различных генераций у человека в норме. Анализ распределения лейомиоцитов по объему цитоплазмы выявил отсутствие значимой корреляционной связи между данным параметром и другими изучаемыми характеристиками. Это позволило выбрать его в качестве основного классифицирующего признака для оценки популяции.

Математический анализ распределения лейомиоцитов в мышечной ткани изучаемых бронхов выявил значительные отклонения от нормы показателей асимметрии и эксцесса, что свидетельствует о неоднородности данной клеточной группы (табл.1). Последующий анализ гистограммы распределения лейомиоцитов бронхов позволил выявить три типа лейомиоцитов — малые, средние и большие, различающиеся по объемным показателям (рис.1). Все выделенные группы клеток характеризуются нормальным характером



Рис.1. Типы гладких миоцитов бронхов человека. а — малый миоцит; б — средний миоцит; в — большой миоцит. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 280$ .

распределения, о чем свидетельствуют показатели асимметрии, эксцесса, и являются представительными, поскольку соответствующие ошибки репрезентативности не превышают 5% (см.табл.1).

Исследование соотношения выделенных типов в структуре популяции показало, что доминирующей является группа средних миоцитов, малые и большие клетки составляют соответственно 39 и 9,4%. Это не противоречит данным, полученным при исследовании гладкой мышцы бронхов у различных лабораторных животных [3,15].

Характер распределения лейомиоцитов бронхов по показателю оптической плотности ядер отражает наличие ди-, три- и тетраплоидных клеток в ее составе. Основная часть популяции представлена диплоидными клетками, которые составляют 77%. Триплоидные и тетраплоидные клетки представлены в меньшем количестве и составляют соответственно 18 и 5%. Это миоциты, находящиеся в митотическом цикле.

Таблица 1

Показатели объема разных типов миоцитов бронхов человека

Типы миоцитов	Средний объем миоцитов ( $\bar{X} \pm Sx$ ) мкм <sup>3</sup>	Эксцесс	Асимметрия	Ошибка репрезентативности, %
Вся популяция	1914,0 $\pm$ 68,4	17,0	3,2	3,6
Малые	717,0 $\pm$ 15,9	-0,6	0,18	1,8
Средние	2122,7 $\pm$ 42,2	-0,4	0,70	1,9
Большие	5728,7 $\pm$ 319,8	-0,6	0,79	4,9



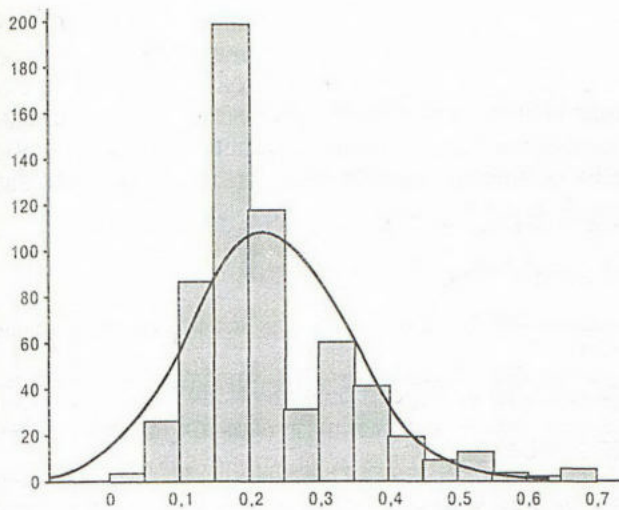


Рис.2. Гистограмма распределения лейомиоцитов бронхов человека по показателю оптической плотности цитоплазмы. По оси абсцисс — оптическая плотность цитоплазмы в усл. ед.; по оси ординат — количество наблюдений.

Анализ плоидности ядер показал, что среди малых миоцитов количество ДНК-синтезирующих клеток наибольшее — 34,5%, в сравнении со средними и большими. Вся субпопуляция больших миоцитов представлена диплоидными клетками. В группе средних миоцитов количество ДНК-синтезирующих элементов составляет 19,2%.

Распределение лейомиоцитов по показателю оптической плотности цитоплазмы, отражающему количество суммарного клеточного белка, имеет бимодальный характер (рис.2). Это позволило выделить в субпопуляциях клетки с низким и высоким его содержанием. Исследование этого показателя в различных типах миоцитов показало, что наибольшее количество клеток с высокой плотностью имеется среди малых миоцитов — 30,5%, меньшее среди средних — 21,2% и больших — 10,7%.

Дальнейший анализ оптической плотности ядер малых миоцитов, с учетом уровня содержания цитоплазматического белка, выявил наличие достоверных различий этого показателя в ядрах миоцитов с высоким и низким содержанием белка ( $p < 0,00001$ ). Изучение характера распределения клеток по плоидности

Таблица 2

**Морфометрические, цитохимические показатели и структура плоидности малых миоцитов бронхов с различным содержанием цитоплазматического белка**

Показатели	Миоциты с высоким содержанием белка	Миоциты с низким содержанием белка
Оптическая плотность ядра, у.е.	0,911±0,032	0,682±0,017
Ядерно-цитоплазмальный индекс	0,076±0,005	0,110±0,005
Плоидность, %		
2n	43	75
3n	29	22
4n	26	2

в этих группах показало, что пролиферирующий пул малых лейомиоцитов с большим содержанием цитоплазматического белка выше, чем в клетках с низким уровнем, о чем свидетельствует более высокое содержание триплоидных клеток в этой группе. Сравнение групп малых лейомиоцитов с высоким и низким уровнем цитоплазматического белка по показателю ядерно-цитоплазмального индекса выявило, что у клеток с низким содержанием белка он достоверно выше ( $p < 0,00007$ ), чем у малых миоцитов с высоким уровнем этого показателя (табл.2). Регрессионный анализ зависимости ядерно-цитоплазматического отношения от содержания клеточного белка в популяции малых миоцитов бронхов свидетельствует о наличии высокодостоверной обратной зависимости (коэффициент корреляции = -0,3), что говорит об уменьшении содержания цитоплазматического белка по мере увеличения ядерно-цитоплазматического отношения. Полученные результаты позволяют предположить, что клеточные элементы в субпопуляции малых миоцитов, характеризующиеся высоким ядерно-цитоплазматическим индексом и низким содержанием внутриклеточного белка, представляют собой камбиальный компонент гладкой мускулатуры бронхов у человека.

Существенной задачей настоящего исследования было дифференцированное изучение структуры кле-

Таблица 3

**Морфометрические показатели и структура плоидности различных типов миоцитов бронхов разных генераций**

Тип миоцитов	Крупный бронх						Средний бронх						Мелкий бронх					
	Объем миоцитов, мкм <sup>3</sup> (X±Sx)	Объем ядра, мкм <sup>3</sup> (X±Sx)	Плоидность ядер, %			Объем миоцитов, мкм <sup>3</sup> (X±Sx)	Объем ядра, мкм <sup>3</sup> (X±Sx)	Плоидность ядер, %			Объем миоцитов, мкм <sup>3</sup> (X±Sx)	Объем ядра, мкм <sup>3</sup> (X±Sx)	Плоидность ядер, %					
			2n	3n	4n			2n	3n	4n			2n	3n	4n			
Вся популяция	2543,90±143,1	90,3±4,1	90	7	3	1803,32±103,61	79,5±3,5	80	16	4	1302,20±64,24	67,8±2,7	53	31	16			
Малые	808,09±30,3	76,7±10,2	84	12	4	729,97±25,88	64,7±4,4	68	23	9	670,71±25,39	62,3±3,1	50	32	18			
Средние	2155,63±67,7	86,6±4,8	90	7	3	2207,36±75,90	89,7±5,5	85	14	1	1994,72±75,41	75,3±4,5	56	30	14			
Большие	5834,96±410,6	118,9±8,9	100			5537,22±401,72	95,9±7,7	100			4646,97±154,33	40,4±14,7	100					





Рис.3. Структура популяции лейомиоцитов бронхов различных генераций человека.

точной популяции мышечной ткани в составе бронхов различных генераций. Количественный анализ средних объемных показателей гладких миоцитов в крупных, средних и мелких бронхах позволил выявить наличие достоверных различий между ними ( $p < 0,0001$ ). Поэтому в дальнейшем нами было проведено раздельное изучение популяций лейомиоцитов бронхов различных генераций. Установлено уменьшение среднего показателя объема клетки по мере увеличения порядка бронха (табл.3). Это обусловлено различиями структуры популяции гладких миоцитов в крупных, средних и мелких бронхах (рис.3). В крупных бронхах средние миоциты составляют 58,4%, крупные 19% и малые 22,6%. В средних и мелких бронхах отмечается уменьшение доли больших и средних миоцитов за счет возрастания доли малых, которые доминируют над остальными клеточными типами. Учитывая характер изменения структуры клеточных популяций крупных, средних и мелких бронхов, закономерна динамика изменения показателя плоидности ядер. Наибольшее количество клеток, находящихся в митотическом цикле, отмечено в мелких, меньшее в средних и крупных бронхах, что свидетельствует о более высоком пролиферативном статусе мускулатуры мелких бронхов (см. табл.3).

Таким образом, в составе стенки бронхов разных генераций у человека имеет место не только различный уровень представительства гладкой мышечной ткани, но и четкие различия структуры популяции лейомиоцитов. Выявление нескольких типов гладких мышечных клеток бронхов соответствует современным представлениям об их возможной фенотипической модуляции [9] и изменению соотношения разных типов лейомиоцитов бронхиального дерева при развитии ряда патологических процессов в органах дыхания [8]. Проведенный анализ позволяет констатировать, что мышечный компонент воздухоносных путей легкого представлен гетероморфной популяцией лейомиоцитов, при этом ее структура меняется в зависимости от уровня бронхов, что, вероятно, обусловлено гистофунк-

циональными особенностями различных отделов бронхиального дерева. Полученные результаты позволяют дать цитоморфологическое обоснование новейшим сведениям [12] о функциональной гетерогенности гладкой мускулатуры бронхиального дерева, являющейся одним из основных компонентов патогенеза ряда заболеваний легких.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вейбель Э.Р. Морфометрия легких человека — М.: Медицина, 1970.
2. Есипова И.К., Алексеевских Ю.Г. Структурно-функциональные особенности крупных и мелких бронхов и различия возникающих в них воспалительных реакций // Арх. пат.— 1994.— № 4.— С.6.
3. Зашихин А.Л., Агафонов Ю.В. Динамика популяции мышечных клеток воздухоносных путей при изменении функциональной нагрузки легких // Пульмонология.— 1994.— № 3.— С.34—41.
4. Непомнящих Г.И. Патологическая анатомия и ультраструктура бронхов при хроническом воспалении легких.— Новосибирск: Наука, 1979.— 294 с.
5. Brown R.H., Herold C.J., Hirshman C.A., Zerhouni E.A., Mitzner W. Individual airway constriction response heterogeneity to histamine assessed by high-resolution computed tomography // J. Appl. Physiol.— 1993.— Vol.74.— P.2615—2620.
6. Chitano P., Sigurdsson S.B., Halayko A.J., Stephens N.L. Relevance of classification by size to topographical differences in bronchial smooth muscle response // Ibid.— Vol.75.— P.2013—2021.
7. Ebina M., Yaegashi H., Takahashi T., Motomiya M., Taneruma M. Distribution of smooth muscle along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs // Am. Rev. Respir. Dis.— 1990.— Vol.141.— P.1322—1326.
8. Ebina M., Takahashi T., Chiba T., Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscle underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study // Ibid.— 1993.— Vol.148.— P.720—726.
9. Halayko A.J., Salari Y., Ma X., Stephens N.L. Markers of airways smooth muscle cell phenotype // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.— 1996.— Vol.270.— P.L1040—L1051.
10. Horsfield K. The Structure of the Tracheobronchial Tree / Ed. J.G.Scadding. G.Cumming, W.M.Thurlbeck.— London: Heinemann, 1981.— P.54—70.
11. James A.L., Pare P.D., Hogg J.C. The mechanics of airway narrowing in asthma // Am. Rev. Respir. Dis.— 1989.— Vol.139.— P.242—246.
12. Ma Xuefei, Li W., Stephens N.L. Detection of two clusters of mechanical properties of smooth muscle along the airway tree // J. Appl. Physiol.— 1996.— Vol.80, № 3.— P.857—861.
13. Mitchell R.W., Kelly E., Leff A.R. Reduced acetylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle homogenates after active immune-sensitization // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.— 1991.— Vol.5.— P.56—62.
14. Ohta K., Mortenson R.L., Clark R.A.F., Hirose N., King T.E.Jr. Immunohistochemical identification and characterization of smooth muscle — like cells in idiopathic pulmonary fibrosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med.— 1995.— Vol.152.— P.1659—1665.
15. Zashikin A., Agafonov Y. Allergen-induced airway Hyperresponsiveness in guinea pigs: the characteristic feature of smooth muscle cell population // Allergy.— 1996.— Vol.51, № 32.— P.194.

Поступила 03.03.97.