

FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF SULFATED GLYCOSAMINOGLYCAN COMPLEX FOR THE CONTROL OF FIBROBLAST PROLIFERATION IN VITRO

*Kh.P. Takhchidi, S. V. Novikov, A. V. Shatzkikh,
Ye. Kh. Takhchidi and K. S. Gorbunova*

The effect of an original sulfated glycosaminoglycan (sGAG) mixture (keratan sulfate with chondroitin sulfate) was examined in the *in vitro* experiment with the cell culture of murine fibroblasts (cell line L929). Two forms (solution and gel) of the active substance were tested in different concentrations (0.1–5.0%). The growth dynamics of fibroblasts in culture was traced for

the periods up to 144 h using the automated digital immersion confocal microscope. The study of the original sGAG mixture demonstrated the bimodal effect: low concentrations (0.1–0.5%) stimulated the proliferation of fibroblasts, while high concentrations (1–5%) possessed an antiproliferative effect. Changes of the form (solution or gel) had no effect on the functional properties of the mixture. High sGAG concentrations (3–5.0%), along with the antiproliferative effect, had a hidden weak cytotoxic action (a delayed effect).

Key words: *glycosaminoglycans (GAG), corneal keratan sulfate, chondroitin sulfate, fibroblasts*

Laboratory of Eye Pathological Anatomy and Histology, S. N. Fyodorov «Eye Microsurgery» Intersectoral Scientific-Technological Complex, Moscow

© Г. С. Шишкин, Н. В. Устюжанинова, 2012
УДК 611.24-055.1(571.14-81)

Г. С. Шишкин и Н. В. Устюжанинова

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЛЕГОЧНОГО АЦИНУСА У ЖИТЕЛЕЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Лаборатория физиологии дыхания (зав. — д-р мед. наук О. В. Гришин), ФГБУ «НИИ физиологии» СО РАМН, г. Новосибирск

Архитектоника и параметры ацинуса легких изучены у 6 мужчин в возрасте 19–27 лет, постоянно проживавших в г. Новосибирске. Исследование проводили на серийных гистологических срезах с использованием морфометрии и объемной графической реконструкции ацинусов. Установлено, что в типичном ацинусе у них определяются 3 порядка ветвления респираторных бронхиол, 4 — альвеолярных ходов и 1 — альвеолярных мешочков (АМ). Все внутриацинарные ходы ветвятся в форме дихотомии, чаще неправильной. Показано, что ацинусы закономерно асимметричны, 32% ветвей альвеолярных ходов второго порядка не имеют продолжения и заканчиваются АМ, от $2/3$ альвеолярных ходов третьего порядка также отходят АМ, т.е. около 40% ветвей рудиментированы. Внутриацинарная дорожка от первых альвеол в респираторной бронхиоле до терминальных альвеол составляет $7,2 \pm 1,0$ мм. Особенностью ацинуса жителей Западной Сибири является увеличение транзитной зоны и смещение респираторной зоны на один порядок ветвления в дистальном направлении от воздухоносных путей, что уменьшает её охлаждение при дыхании холодным воздухом в зимнее время года.

Ключевые слова: *ацинус легких человека, микроструктуры ацинуса, транзитная и респираторная зоны*

Детальное строение легочных ацинусов с определением архитектоники и параметров их микроструктур было изучено в основном у животных — мышей, крыс, кроликов [12, 13, 16]. Современные морфологические представления о строении легочного ацинуса у человека, как системы ветвящихся ходов и соединённых с ними альвеол, базируются исключительно на исследовании лёгких у людей из Центральной Европы и Северной Америки [3, 4, 6, 8, 14, 15]. При этом авторы не единодушны в выборе критериев разделения ацинарных структур на респираторные

бронхиолы, альвеолярные ходы (АХ) и альвеолярные мешочки (АМ).

После работ Э. Вейбеля [1, 17, 18], который исследовал легочный ацинус у человека и постулировал дихотомическую схему ветвления микроструктур, других исследований такого объема фактически не было. Полностью отсутствуют сведения о структурных особенностях, архитектонике, объемах ацинарных структур у жителей разных климато-географических регионов.

Цель настоящей работы — изучение особенностей строения лёгочного ацинуса у жителей

Сведения об авторах:

Шишкин Геннадий Сергеевич, Устюжанинова Нина Витальевна (e-mail: nvu@physiol.ru), лаборатория физиологии дыхания, ФГБУ «НИИ физиологии» СО РАМН, 630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

Западной Сибири, которая по своим климатическим условиям значительно отличается от Центральной Европы и США.

Материал и методы. Структура легочного ацинуса изучена у 6 мужчин в возрасте 19–27 лет, постоянно проживавших в г. Новосибирске на протяжении всей жизни и погибших в результате черепно-мозговых травм. Материал был получен из Бюро судмедэкспертизы не позднее 12 ч после смерти. Исследование проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинская декларация 2000 г. Директивы Европейского сообщества 86/609) и одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН.

Образцы ткани объемом 1 см³ были взяты из подплевральных участков по переднему краю нижней правой доли легкого. При исследовании строения легких мы придерживались классической схемы деления легочного ацинуса на следующие структуры: респираторные бронхиолы (РБ), альвеолярные ходы (АХ), альвеолярные мешочки (АМ) и альвеолы [1, 6, 17, 18]. Материал фиксировали в 12% нейтральном формалине и заливали в парафин. С каждого блока готовили по 100 серийных срезов толщиной 10 мкм, которые через один окрашивали гематоксилином–эозином и по Ван-Гизону с докраской эластических волокон фукселином. С каждого препарата делали микрофотографию, по совокупности которых проводили графическую объемную реконструкцию ацинуса. Определяли параметры его структур, и полученные данные пересчитывали с учетом увеличения микроскопа и коэффициентов усадки при фиксации и проводке. Объем ацинарных структур определяли методом планиметрии микрофотографий. Рассчитывали площадь поверхности альвеолярной фракции каждой структуры ацинуса и её отношение к общей поверхности структуры. Определяли относительные объемы структур, мы не переводили результаты измерений в СИ-единицы (мм³), так как планиметрия микрофотографий не позволяет сделать это с достаточной точностью. Для ориентировки можно указать, что в спавшихся легких, фиксированных формалином, объем ацинуса, определенный методом трехмерной компьютерной микрофотографии [10], составляет 131±29 мм³ (n=12), а площадь его поверхности — 1012±26 см².

Результаты исследования. Анатомически ацинус начинается от терминальной бронхиолы, которая делится на 2 РБ первого порядка (РБ-1). У сибиряков РБ-1 имеют на поперечном срезе овальную форму, стенки у них довольно гладкие с небольшим числом мелких альвеол. Стенки терминальных бронхиол полностью выстланы реснитчатым эпителием. Он заходит и в РБ-1, где обычно покрывает проксимальную часть одной из стенок на $\frac{1}{3}$ длины бронхиолы. РБ-1 дихотомически делятся на РБ второго порядка (РБ-2). В каждом ацинусе их имеется по 4. Это довольно крупные воздушные камеры с почти гладкой внутренней стенкой, в каждую из них открываются 3–5 альвеол, как правило, располагающихся с одной стороны бронхиолы. Реснитчатый эпителий в РБ-2 имеется только в виде небольших островков на одной из стенок.

РБ-2 всегда дихотомически делятся на РБ третьего порядка (РБ-3). В каждом ацинусе их 8. РБ-3 могут быть коленообразно изогнуты, их стенки неровные, так как в них открывается значительное количество альвеол, создающих внешнюю линию этой структуры. Таким образом, РБ первых 3 порядков — это РБ, которые делятся путем неправильной дихотомии. Ацинарное дерево на уровне РБ фактически симметрично.

АХ — это части ацинуса, образовавшиеся в результате дихотомического деления РБ-3 или другого АХ, расположенного проксимальнее. В отличие от РБ, в АХ открывается гораздо больше альвеол. Их число и размер увеличиваются в дистальном направлении. В АХ последнего порядка стенки сохраняются лишь в виде небольших промежутков между альвеолами. При делении АХ последнего порядка образуются АМ, в которых альвеолы разделены невысокими перегородками. В ацинусе, типичном для жителей Западной Сибири насчитывается 8 порядков ветвлений (3 порядка РБ, 4 — АХ и 1 — АМ). Все внутриацинарные ходы разветвляются только дихотомически, чаще всего неправильно.

Были также определены значения внутриацинарной дорожки, т.е. расстояния, которое проходит молекула кислорода внутри ацинуса от входа до конца АМ, включая последние альвеолы. Начало дорожки — от места появления в РБ-1 первых альвеол. Длина дорожки зависит от размера ацинуса и от порядка ветвления, которым он заканчивается, может оцениваться в миллиметрах, или ориентировочно числом порядков ацинарных ветвлений. В разных ацинусах у жителей Западной Сибири внутриацинарная дорожка включает 7–8 ветвлений ходов, составляя 7,2±1,0 мм.

Обнаружено, что ацинусы у жителей Западной Сибири закономерно асимметричны. Так, 32% ветвей АХ второго порядка (АХ-2) не имеют продолжения и переходят в АМ. От $\frac{2}{3}$ АХ третьего порядка (АХ-3) также отходят АМ и только от $\frac{1}{3}$ — АХ делятся на АХ четвертого порядка (АХ-4). Таким образом, у жителей Западной Сибири около 40% ветвей подверглись рудиментации.

Несмотря на отчетливо выраженную асимметрию, архитектура внутриацинарных ходов не хаотична. В ветвлениях АХ отмечается довольно четкая закономерность, которой подчиняются 63% этих структур. В данном случае РБ-3 делятся на 2 АХ-2. Однако дальше идут неравноценные ветви. От одного АХ-2 отходят 2 АХ-3, заканчивающиеся двумя АМ каждый. Второй АХ-2 делится сначала на АХ-3 и АМ, затем АХ-3 образует два АХ-4, заканчивающиеся 4 АМ. Таким образом, образуется типичный структурный элемент аци-

нуса. В нем насчитывается 1 АХ-1, 2 АХ-2, 3 АХ-3, 2 — АХ-4 и 9 — АМ. Наряду с типичными, в ацинусах жителей Западной Сибири встречаются структурные элементы с меньшим числом АХ и АМ, т.е. не полностью развитые. В них может быть 5 АХ и 6 АМ или 4 АХ и 6 АМ и т.д. Иногда подвергшиеся рудиментации ветви встречаются при четвертом порядке деления. Всего в среднестатистическом ацинусе у жителей Западной Сибири насчитывается 225 структур, из которых 50% (112) составляют АМ.

Определение относительных объемов всех воздушных пространств ацинуса показало, что самой крупной структурой являются РБ-1 (таблица). При этом они сильно отличаются друг от друга. Как правило, одна из двух РБ-1 — длинная и узкая, а вторая — короткая и широкая. Среднестатистическая РБ-2 немного меньше. Они мало отличаются друг от друга как в одном ацинусе, так и в разных ацинусах. РБ-3 не отличаются от РБ-2. Однако для них характерна значительная вариабельность размеров. Даже внутри одного ацинуса они различаются по объему в 2–3 раза. Несмотря на то, что РБ крупнее других структур, поскольку их мало, их суммарный объем составляет всего 10% объема ацинуса.

Объем АХ составляет $0,48 \pm 0,03\%$ объема ацинуса. Самые крупные из них АХ-3, а самые мелкие — АХ-2. АМ меньше АХ на 20%. Общий объем АХ вместе с открывающимися в них альвеолами составляет в ацинусе 47%, а АМ — 42%, т.е. по диффузионной способности они сопоставимы.

РБ всех трех порядков проводят воздух к основным газообменным структурам (АХ и АМ) и лишь частично участвуют в газообмене. Это так называемая транзитная зона. Критерием отнесения структуры ацинуса к транзитной или

респираторной зоне может служить доля поверхности альвеолярной фракции данной структуры от общей площади поверхности структуры (S_{AT}). Если S_{AT} превышает 50% общей площади, то структуру можно отнести к респираторной зоне, если меньше — то к транзитной. РБ всех трех порядков (РБ-1, РБ-2, РБ-3) и АХ-1, в которых она не превышает 12–17% от общей площади, нужно относить к транзитной зоне. В АХ-3 и АМ респираторная поверхность составляет 66–88% от общей площади, т.е. они, несомненно, относятся к респираторной зоне (рис. 1).

Особо необходимо остановиться на характеристике АХ-2. Если считать в среднем, то альвеолярная поверхность в них составляет 44%. Однако анализ распределения её величины в легких разных людей выявил, что эта средняя реально не существует. Встречаемость альвеолярной фракции, занимающей от 40 до 50% общей поверхности, составляет всего 3–4%. Исследованные нами легкие делятся на 2 группы: в 4 легких АХ-2 имеют больше 50% респираторной поверхности и относятся к респираторной зоне, а в 2 — площадь респираторной поверхности в АХ-2 варьирует от 18 до 47% (в среднем 25,5%), и их следует относить к транзитной зоне (рис. 2). Соответственно принадлежности АХ-2 к той или другой зоне объемы зон у разных людей будут неодинаковыми. Поэтому у 4 мужчин респираторная зона составляла в среднем 85,7%, а у 2 — она была равна в среднем 71,5% объема респираторных отделов легких (РОЛ). Транзитная зона составляет соответственно 14,3 и 28,5% объема РОЛ.

Площадь респираторной поверхности в структурах транзитной зоны невелика (см. рис. 2). В респираторной зоне она в 5–6 раз больше. Поэтому объемы газообмена не соответствуют объему зон. Транзитная зона у разных людей обеспечивает от 9,3 до 22,6% потребления кислорода и выделения двуокиси углерода.

О б с у ж д е н и е
полученных данных. Объемная реконструкция и анализ архитектоники и параметров ацинуса легких у жителей Западной Сибири показали, что по своему строению и числу ветвлений его структур он соответствует таковым у жителей Центральной Европы и США [1, 6]. В нем определяются 3 порядка ветвлений РБ, 4 — АХ и АМ. Все вну-

Доля объема различных структур легочного ацинуса от его общего объема у жителей Западной Сибири ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Структуры ацинуса	Количество структур в ацинусе	Средний объем структуры	Суммарный объем в ацинусе
Респираторные бронхиолы (РБ):			
РБ-1	2	0,85	1,7
РБ-2	4	0,75	3,0
РБ-3	8	0,72	5,8
Альвеолярные ходы (АХ):			
АХ-1	14	$0,44 \pm 0,06$	6,2
АХ-2	25	$0,32 \pm 0,02$	8,0
АХ-3	34	$0,64 \pm 0,04$	21,8
АХ-4	26	$0,43 \pm 0,04$	11,2
Альвеолярные мешочки	112	$0,38 \pm 0,03$	42,4

триацинарные ходы ветвятся только в форме дихотомии, чаще всего неправильной.

Обнаружено, что у жителей Западной Сибири ацинус закономерно асимметричен. Только 75% ветвей АХ-2 образуют АХ-3, а остальные ветви заканчиваются АМ. АХ-3 делятся на АХ-4 только в $\frac{1}{3}$ случаев. Асимметрия внутриацинарных ветвей, очевидно, является закономерным продолжением асимметрии большинства ветвлений бронхиального дерева человека [2, 7]. Кроме того, у жителей Западной Сибири 37% ветвей претерпели рудиментацию, причем некоторые полностью. Поэтому у них в ацинусе меньше АХ (на 23%) и АМ (на 21%). В то же время, статистический анализ показывает, что такая степень рудиментации является естественной, а сам ацинус нужно считать нормальным. Вероятно, рудиментация ветвей присуща ацинусам жителей и других регионов, но она не была описана ранее только потому, что не проводился достаточно полный комплексный анализ параметров.

Э. Р. Вейбель [1], выделив в респираторных отделах легких транзитную и респираторную зоны, не дал четкого критерия их разделения. Респираторную зону он рассматривал как совокупность альвеол легкого, независимо от их местонахождения, т.е., по существу, он анализировал альвеолярную фракцию легкого как компонент объема. Мы рассматриваем транзитную и респираторную зоны как структурные образования, скомпонованные в ацинусе. Выраженность участия в газообмене зависит от числа альвеол, открывающихся в их стенках, и доли поверхно-

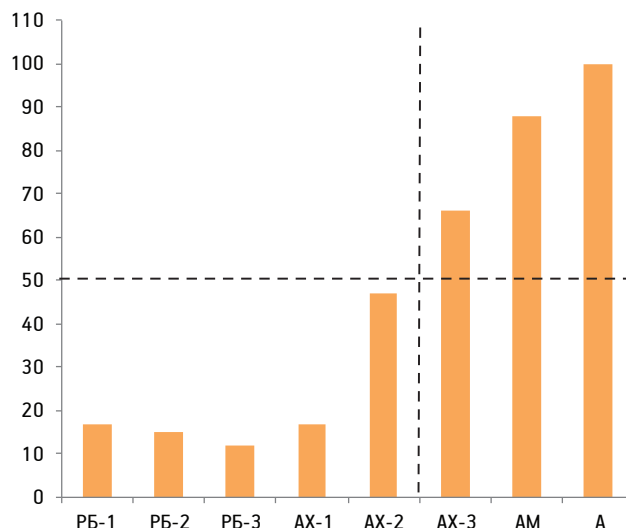


Рис. 1. Относительная площадь респираторной поверхности в разных структурах ацинуса у мужчин — жителей Западной Сибири.

По горизонтальной оси: структуры ацинуса: РБ-1, РБ-2, РБ-3 — респираторные бронхиолы различных порядков ветвления; АХ-1, АХ-2, АХ-3 — альвеолярные ходы различных порядков ветвления; АМ — альвеолярные мешочки; А — альвеолы; по оси ординат — доля площади респираторной поверхности (%) от общей площади данной структуры, принятой за 100.

сти, покрытой альвеолярным эпителием [5, 9, 17]. Объем респираторной зоны Э. Р. Вейбель [1] оценил в 67,8% объема паренхимы. По данным М. Ochs и соавт. [11], он составляет 70%. Это полностью соответствует средней величине в нашем исследовании (68,2%).

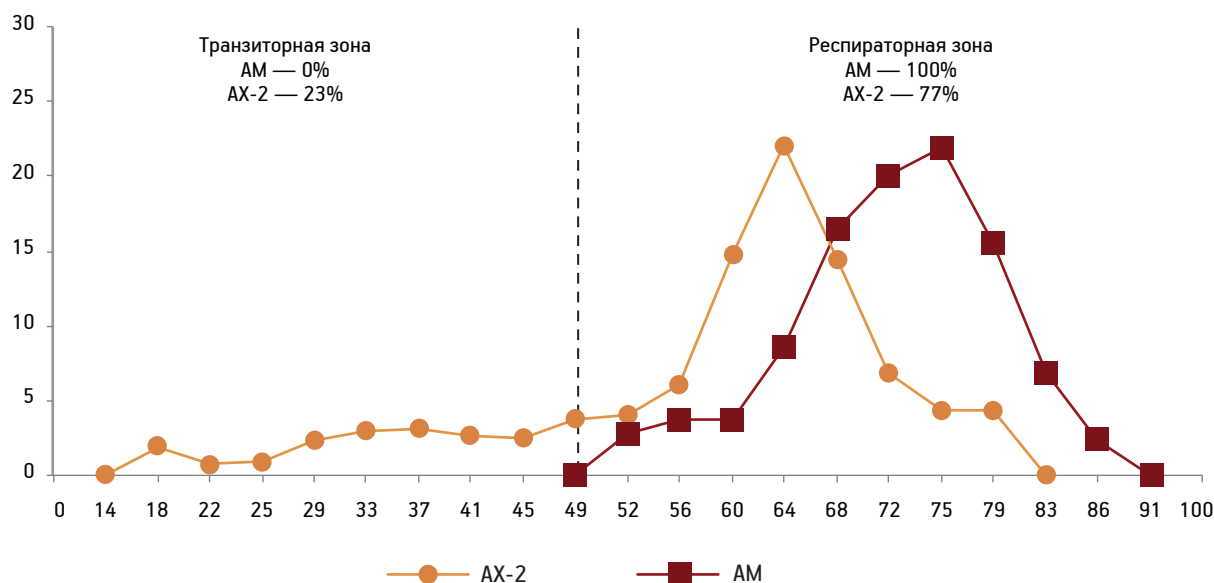


Рис. 2. Распределение значений площади респираторной поверхности у жителей Западной Сибири в альвеолярных ходах второго порядка (АХ-2) по сравнению с таковыми в альвеолярных мешках (АМ).

По оси абсцисс — доля площади респираторной поверхности от общей площади поверхности структуры ацинуса; по оси ординат — встречаемость структур (%).

Очень важной особенностью ацинуса жителей Западной Сибири является смещение респираторной зоны в дистальном направлении от воздухоносных путей. Транзиторная зона у них больше. Кроме проникновения бронхиального эпителия в РБ-1, РБ-2 и РБ-3 и уменьшения числа альвеол в их стенках, к транзиторной зоне относятся все АХ-1. По данным Э. Р. Вейбеля [1], объем РБ у американцев составляет 13% объема ацинуса. У жителей Западной Сибири транзиторная зона за счет АХ-1 увеличена до 17%, т.е. на $\frac{1}{4}$, а респираторная зона смещена дистально на один порядок ветвления. В результате у них вдыхаемый холодный воздух в зимнее время года до прохождения в респираторную зону смешивается дольше и с большим объемом теплого альвеолярного газа. При этом в ацинусах жителей Западной Сибири АМ очень крупные. По объему они мало отличаются от АХ. Вследствие этого площадь респираторной поверхности значительно увеличена в самой дистальной и наиболее термостабильной части ацинуса.

Обнаруженные особенности, по-видимому, указывают на то, что в ацинусах у жителей Западной Сибири имеют место адаптивные морфологические перестройки, направленные на уменьшение охлаждения респираторной зоны при действии суровых климатических факторов Сибири в зимнее время года.

ЛИТЕРАТУРА

- Вейбель Э. Р. Морфометрия легких человека. М., Медицина, 1970.
- Шишкин Г. С., Гончаров В. В., Валицкая Р. И. и др. Структурная организация легочной долики человека. Морфология, 1999, т. 116, вып. 4, с. 45–47.
- Berend N., Rynell A. C. and Ward H. E. Structure of a human pulmonary acinus. *Torax*, 1991, v. 46, № 2, p. 117–121.
- Ciurea D. and Gil J. Morphometric study of human alveolar ducts based on serial sections. *J. Appl. Physiol.*, 1989, v. 67, № 6, p. 2512–2521.
- Felici M., Filoche M., Straus C. et al. Diffusional screening in real 3D human acini — a theoretical study. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2005, v. 145, № 2–3, p. 279–293.
- Haefeli-Bleuer B. and Weibel E. Morphometry of the Human Pulmonary Acinus. *Anat. Rec.*, 1988, v. 220, № 4, p. 401–414.
- Horsfield K. and Cumming G. Morphology of the bronchial tree in men. *J. Appl. Physiol.*, 1968, v. 24, № 3, p. 373–383.
- Kumar H., Tawhai M. H. and Hoffman E. A. The effects of geometry on airflow in the acinar region of the human lung. *J. Biomech.*, 2009, v. 42, № 11, p. 1635–1642.
- Leeming A. and Schroter R. A model morphology of the pulmonary acinus. *Proc. Inst. Mech. Eng. H.*, 2008, v. 222, № 4, p. 429–437.
- Litzlbauer H. D., Korbel K., Kline T. L. et al. Synchrotron-based micro-CT imaging of the human lung acinus. *Anat. Rec.*, 2010, v. 293, № 90, p. 1607–1614.
- Ochs M., Nyengaard J. R., Jung A. et al. The number of alveoli in the human lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004, v. 169, № 1, p. 120–124.
- Parameswaran H., Bartolák-Suki E., Hamakawa H. et al. Three-dimensional measurement of alveolar airspace volumes in normal and emphysematous lungs using micro-CT. *J. Appl. Physiol.*, 2009, v. 107, № 2, p. 583–582.
- Rodriguez M., Bur S. and Favre A. Pulmonary acinus: geometry and morphometry of the peripheral airway system in rat and rabbit. *Am. J. Anat.*, 1987, v. 180, № 2, p. 143–145.
- Sapoval B., Filoche M. and Weibel E. R. Smaller is better — but not too small: a physical scale for the design of the mammalian pulmonary acinus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, v. 99, № 16, p. 10411–10416.
- Scarpelli E. M. The alveolar surface networks new anatomy and physiological significance. *Anat. Rec.*, 1998, v. 251, № 4, p. 491–527.
- Tsuda A., Filipovic N., Haberthür D. et al. Finite element 3D reconstruction of the pulmonary acinus imaged by synchrotron X-ray tomography. *J. Appl. Physiol.*, 2008, v. 105, № 3, p. 964–976.
- Weibel E. R. What makes a good lung? *Swiss. Med. Wkly.*, 2009, v. 139, № 27–28, p. 375–386.
- Weibel E. R., Sapoval B. and Filoche M. Design of peripheral airways for efficient gas exchange. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2005, v. 148, № 1–2, p. 3–21.

Поступила в редакцию 12.03.2012

Получена после доработки 05.09.2012

THE PECULIARITIES OF THE PULMONARY ACINUS STRUCTURE IN THE RESIDENTS OF WESTERN SIBERIA

G. S. Shishkin and N. V. Ustyuzhaninova

Pulmonary acinus architectonics and parameters were studied in six men aged 19–27 years that permanently lived in the city of Novosibirsk. The study was conducted on the serial histological sections by using morphometry and volumetric graphic reconstruction of the acini. In a typical acinus, three generations of the respiratory bronchioles, four generations of the alveolar ducts, and one generation of the alveolar sacs (AS) were found. All the intraacinar components branched in the form of dichotomy, most commonly, irregular. It was shown that the acini were regularly asymmetrical, 32% of branches of the alveolar ducts of the second order had no continuation and ended with AS. In the same way, two thirds of the third order alveolar ducts also continued into AS, i. e. about 40% of branches are rudimentary. Intra-acinar path from the first alveoli in the respiratory bronchioles to the terminal alveoli is equal to 7.2 ± 1.0 mm. The peculiar feature of the acinus of the Siberian residents is an increased transitional zone and a distal shift of respiratory zone by one generation of branches in the direction from the conducting airways, which reduces its cooling during breathing cold air in winter.

Key words: human pulmonary acinus, acinar microstructures, transitional zone, respiratory zone

Laboratory of Respiratory Physiology, Scientific Research Institute of Physiology, RAMS Siberian Branch, Novosibirsk