

*В.А.Березовский, Р.В.Янко, Е.Г.Чака, И.Г.Литовка*

## Влияние прерывистой гипо- и гипероксии на состояние респираторного отдела легких

Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины: 01024, Киев, ул. Богомольца, 4

*V.A.Berezovsky, R.V.Yanko, E.G.Chaka, I.G.Litovka*

## The influence of intermittent hypoxia and hyperoxia on the respiratory part of the lungs

### Summary

An influence of normobaric hypoxic (10 % of oxygen in nitrogen) and hyperoxic (40 % of oxygen in nitrogen) breathing sessions on the respiratory part of the lungs was investigated in rats of 3 month of age. After 28 daily hypoxic sessions, 30 min each, we detected lung hyperinflation, an enlargement of the total alveolar area and reduction in connecting tissue elements in the lungs. After 28 daily hyperoxic sessions, 60 min each, we found reduction in mean diameter, depth, cross-sectional area and the entrance size of alveoli, increased the amount of collagen fibers, the alveolar wall thickness and increased oxyproline concentration in the lungs. These findings could indicate the connecting tissue growth in the respiratory part of the lungs and worsening of oxygen diffusion through the blood-air barrier.

**Key words:** intermittent hypoxia, intermittent hyperoxia, lung.

### Резюме

Исследовалось влияние сеансов дыхания нормобарической гипо- (10 % кислорода в азоте) и гипероксической (40 % кислорода в азоте) газовой смесью на состояние респираторного отдела легких 3-месячных крыс. После 28 ежедневных (по 30 мин) сеансов гипоксии обнаружилось увеличение воздушности респираторного отдела и общей площади альвеолярной поверхности, снижение количества элементов соединительной ткани в легких, уменьшение среднего диаметра, глубины, площади поперечного сечения альвеол, ширины входа в альвеолу, увеличение количества коллагеновых волокон, толщины межальвеолярной перегородки и концентрации общего оксипролина в легких. Это может свидетельствовать о разрастании соединительной ткани в респираторном отделе легких, ухудшении условий диффузии кислорода через аэрогематический барьер.

**Ключевые слова:** прерывистая гипоксия, прерывистая гипероксия, легкое.

По статистическим данным за 2010 г., смертность от патологии органов респираторной системы в Украине находится на 3-м месте после сердечно-сосудистых заболеваний и онкологии [1]. При патологии органов дыхания часто происходит разрастание (фиброз) соединительной ткани (СТ) легких, что приводит к угнетению их функциональной активности [2]. Поэтому поиск новых путей и методов предупреждения развития фиброза и оптимизации процессов газообмена в легких является актуальным и целесообразным.

В последние годы значительное внимание уделяют исследованиям, направленным на изучение действия на организм человека и животных газовых смесей (ГС) с различным парциальным давлением кислорода ( $PO_2$ ). Полученные разными авторами данные по изучению влияния гипо- и гипероксических ГС на состояние респираторного отдела легких различаются. Это может быть связано с неодинаковыми условиями проведения экспериментов: применение разного уровня  $PO_2$ , режимов и длительности подачи ГС, использование лабораторных животных разного возраста и т. д. [3–7].

В экспериментах, результаты которых приведены в данной статье, использована гипоксическая ГС саногенного уровня (10 % кислорода в азоте) [8]. Ее позитивное влияние показано на функционирова-

нии многих органов и систем организма [3, 7, 9]. Также исследована гипероксическая ГС с 40%-ным содержанием кислорода, которую часто применяют в клинике для устранения различных форм гипоксии.

Целью работы явилось исследование влияния дозированной гипо- и гипероксической ГС на морфометрические показатели респираторного отдела и состояние СТ в легких молодых крыс.

### Материалы и методы

Эксперименты были проведены в течение 28 сут. на 36 половозрелых белых лабораторных крысах-самцах линии Вистар 3-месячного возраста. Исходная масса тела животных в среднем составляла  $280 \pm 10$  г. Из животных были сформированы следующие группы: 1-я — контрольная группа, 2 и 3-я — крысы, которым подавали дозированную нормобарическую гипоксическую ГС. Крыс 2-й группы размещали в герметичной камере, в которую с помощью мембранного газораспределительного элемента ежедневно подавали ГС (10 % кислорода в азоте) в прерывистом режиме: 10 мин дезоксигенация / 30 мин — реоксигенация в течение 3 циклов. Животным 3-й группы в такой же камере в течение 60 мин ежедневно подавали нормобарическую гипероксическую ГС

с 40%-ным содержанием кислорода. Всех крыс содержали на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к воде и корму. Выведение животных из эксперимента проводили под эфирным наркозом с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

По окончании эксперимента были отобраны образцы ткани легких для гистоморфологических и биохимических исследований. Гистологические препараты изготавливали по стандартной методике: образцы ткани фиксировали в жидкости Буэна, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином Бемера – эозином и 2%-ным кислым пикрофуксином в сочетании с железным гематоксилином Вейгерта (модифицированный метод окраски СТ по Ван-Гизону) [10]. Микропрепараты фотографировали на микроскопе *Olympus* (Япония).

Морфометрические измерения в респираторном отделе легких осуществляли с помощью компьютерной программы *IMAGE J*. На гистологических срезах ткани легких измеряли средний диаметр, глубину, площадь поперечного сечения альвеол, определяли ширину входа в альвеолу, толщину межальвеолярной перегородки (МП), диаметр респираторных бронхиол (РБ), альвеолярных ходов (АХ) и альвеолярных мешочков (АМ). Морфометрические измерения проводили на срезах, где четко видны АХ и альвеолы [11].

Концентрация общего оксипролина в ткани легких определялась фотометрически, методом окисления гидроксипролина с хлорамином Т (метод Т.П.Кузнецовой и др.).

Полученные данные обрабатывались методами вариационной статистики с помощью программного обеспечения *Statistica for Windows 6.0* и программы *Microsoft Exel 2010*. Достоверность различий между контрольными и экспериментальными группами оценивались по t-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Увеличение массы легких на 17 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем наблюдалось только у животных 2-й группы, которые вдыхали гипоксическую ГС. Возрастание общей массы легких может быть связа-

но с полнокровием капилляров сосудистого русла. Известно, что дыхание гипоксическими ГС увеличивает кровенаполнение и ускоряет микроциркуляцию в органах и тканях за счет раскрытия резервных капилляров, а также образования новых, ранее не существовавших сосудов [8, 12]. На выполненных срезах полнокровие сосудов после влияния гипоксической ГС также подтверждено. После вдыхания гипероксической ГС изменений общей массы легких не происходило. Этот факт можно рассматривать как подтверждение европейских установок на отсутствие ощутимых повреждений легких при дыхании ГС с 40%-ным содержанием кислорода.

Большая часть альвеол легкого у крыс 2 и 3-й групп находилась в нормальном состоянии, меньшая часть – в состоянии физиологического ателектаза, или умеренного расширения. На гистологических срезах трудно отчетливо разглядеть структурное различие между АХ и АМ. Поэтому их рассматривают как одну группу. Также не всегда удается различить РБ и АХ. Следовательно, не представляется возможным строго разграничить эти классы [11].

Морфометрические показатели состояния респираторного отдела легких под влиянием подачи гипо- и гипероксической ГС изменялись по-разному. Так, после влияния гипоксической ГС (10 % кислорода) отмечена тенденция к увеличению среднего диаметра, глубины, площади поперечного сечения альвеол, ширины входа в альвеолу и ширины РБ, АХ и АМ по сравнению с контролем. Соотношение ширины входа в альвеолу к ее глубине имело тенденцию к снижению (см. таблицу). Таким образом, вдыхание гипоксической ГС в прерывистом режиме увеличивает общую площадь альвеолярной поверхности, воздушность легких, однако не достигает размеров, типичных для эмфизематозного состояния. Это способствует возрастанию эффективности газообмена легких.

После воздействия гипероксической ГС (40 % кислорода) морфометрические показатели респираторного отдела легких изменялись в обратном направлении. Достоверно снижались средний диаметр и глубина альвеолы (на 20 % и 21 % соответственно) по сравнению с контролем. При этом площадь поперечного сечения альвеолы уменьшилась на 43 % ( $p < 0,05$ ). Показатели ширины входа в альвеолу и ширины РБ, АХ и АМ имели лишь тенденцию к сниже-

**Таблица**  
**Морфометрические показатели респираторного отдела легких 3-месячных крыс ( $n = 12$ ) после влияния дозированной нормобарической гипо- и гипероксической ГС**

Показатель	Контрольная группа	Гипоксическая ГС	Гипероксическая ГС
Средний диаметр альвеолы, мкм	43,9 ± 1,5	48,50 ± 2,16	35,10 ± 1,67*
Глубина альвеолы, мкм	46,20 ± 2,64	51,1 ± 3,81	36,40 ± 1,14*
Ширина входа в альвеолу, мкм	30,30 ± 1,31	30,5 ± 1,54	27,30 ± 1,62
Площадь альвеолы, мкм <sup>2</sup>	2 823 ± 107	2 860 ± 209	1 620 ± 105*
Ширина РБ, АХ и АМ, мкм	107,00 ± 5,79	109,0 ± 9,6	101,00 ± 7,94
Отношение ширины входа в альвеолу к ее глубине	0,66 ± 0,021	0,600 ± 0,034	0,76 ± 0,05
Отношение диаметра РБ, АХ и АМ к удвоенной глубине альвеолы	1,14 ± 0,05	1,07 ± 0,02	1,40 ± 0,13*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с группой контроля.



нию. Отношение ширины входа в альвеолу к ее глубине у крыс 3-й группы было выше, чем в контроле на 15 % (см. таблицу). Морфометрические изменения респираторного отдела при гипероксии дают основания говорить о негативном влиянии ГС с 40%-ным содержанием кислорода на состояние легких. Это подтверждается снижением общего объема альвеол, площади альвеолярной поверхности, что ухудшает эффективность процессов газообмена.

При окраске гистологических препаратов легких по методу Ван-Гизона не было выявлено существен-

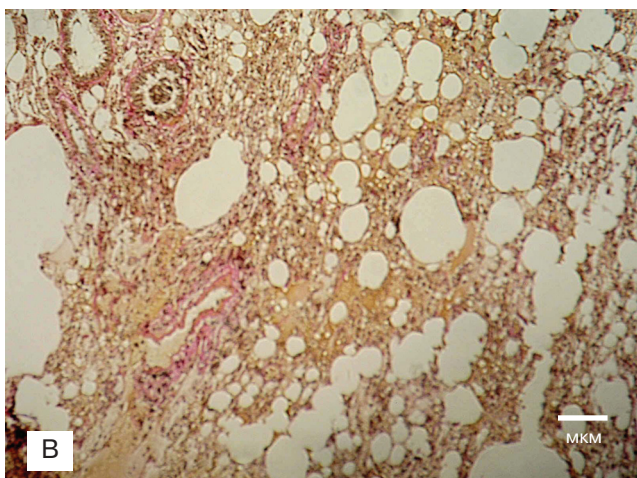
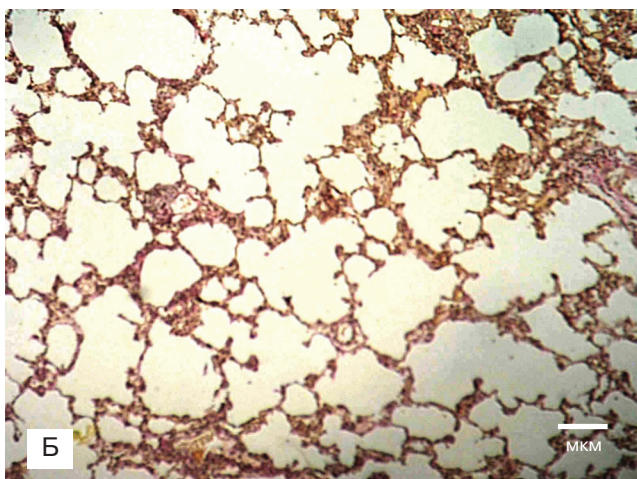
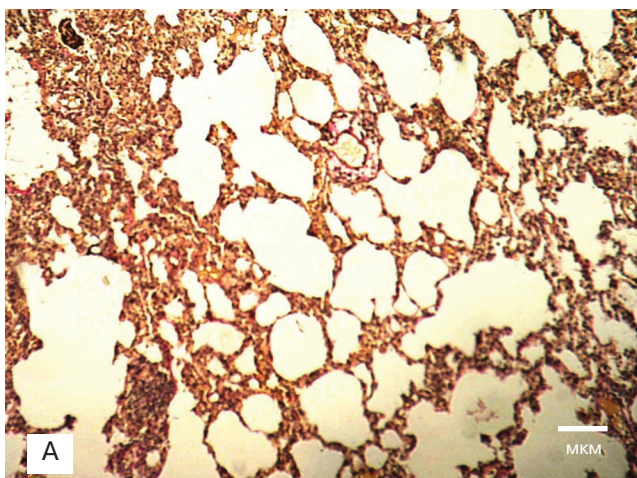


Рис. 1. Микрофотография легких крысы контрольной группы (А) после влияния гипо- (Б) и гипероксической ГС (В). Окраска по Ван-Гизону;  $\times 100$

ных отличий в количестве коллагеновых волокон между контролем и животными, которые испытывали влияние гипоксической ГС. В то же время у крыс, получавших гипероксическую ГС, количество коллагеновых волокон в респираторном отделе существенно увеличилось. Наибольшее количество коллагеновых волокон располагалось вокруг РБ, кровеносных сосудов; меньшее — в МП (рис. 1).

МП состоит из эпителиальных слоев альвеол, подэпителиальных базальных мембран, сетки капилляров, а также эластических, ретикулярных и коллагеновых волокон [13]. Толщина МП в легких контрольных животных в среднем составляла 6,7 мкм. После вдыхания гипоксической ГС толщина МП имела тенденцию к снижению. А после 28 сеансов воздействия гипероксической ГС отмечалось достоверное увеличение толщины МП — на 46 % по сравнению с контрольной группой (рис. 2). Рост толщины МП может быть связан с разрастанием соединительнотканых волокон в ней. Это приводит к изменению скорости газообмена и вентиляции легких [13].

Коллаген — структурный компонент СТ. Его характерной особенностью является высокое содержание оксипролина (12–14 %). Это позволяет считать оксипролин специфическим маркером коллагена, по концентрации которого можно судить о скорости катаболизма коллагена. Определение концентрации оксипролина часто используют для оценки состояния СТ в различных органах [10].

У животных 2-й группы выявлено достоверное снижение концентрации оксипролина в ткани легкого на 21 % по сравнению с контрольной группой. Снижение концентрации оксипролина может свидетельствовать об усилении деструкции или торможении синтеза коллагена. Другими исследователями показано увеличение концентрации оксипролина и десмозина, экспрессии генов коллагена и фактора роста в ткани легких под воздействием гипобарической [14] и нормобарической гипоксии (2 % кислорода) [15]. По-видимому, различная степень гипоксии и атмосферного давления создает возможность и других реакций.

После воздействия гипероксии (40 % кислорода) была отмечена тенденция к повышению концентрации общего оксипролина. Это согласуется с данными

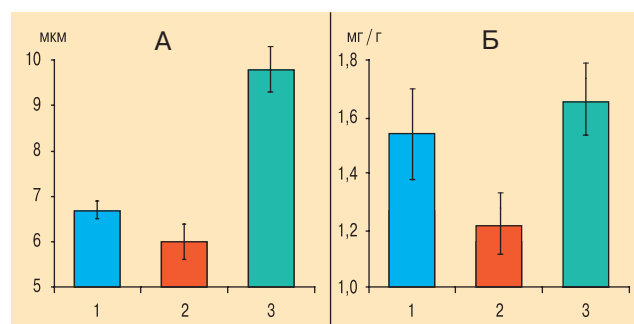


Рис. 2. Толщина межальвеолярной перегородки (А) и концентрация общего оксипролина в ткани легких (Б)

Примечание: 1 — контрольная группа, 2 — после влияния гипоксической, 3 — гипероксической ГС; \* —  $p < 0,05$  — достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

других авторов и может свидетельствовать об увеличении общей массы СТ в легких (см. рис. 2) [6].

Реакция организма на действие гипероксической ГС зависит от уровня  $PO_2$  и длительности его воздействия. Вначале она направлена на приспособление к новым условиям: снижается частота дыхания, объемы легочной вентиляции и циркулирующей крови в легких. С увеличением  $PO_2$  и удлинением экспозиции развиваются патологические процессы, вплоть до отека легкого [16].

Показано, что у новорожденных крысят, вдыхавших в течение 1 нед. ГС с 95%-ным содержанием кислорода, а в последующие 2 нед. — ГС с 60%-ным содержанием кислорода, повышалась как концентрация коллагена, так и экспрессия гена коллагена 1-го типа [17]. У кроликов, вдыхавших ГС с 90%-ным содержанием кислорода, наблюдалось увеличение размеров и уменьшение количества альвеол. При этом плотность коллагеновых фибрилл снижалась, а эластиновых — не изменялась [6].

Установлено, что аэрогематический барьер легких у животных раннего возраста более чувствителен как к недостатку, так и к избытку кислорода во вдыхаемой ГС [5]. Так, после воздействия гипоксической ГС (11 % кислорода) у 2-недельных крыс развивались изменения в ультраструктуре аэрогематического барьера, приводившие к его утолщению. При дыхании гипероксической ГС (90 % кислорода) в течение 30 мин обнаружено еще более значительное утолщение аэрогематического барьера, увеличение проницаемости капилляров легких, чего не было отмечено после вдыхания ГС с 40%-ным содержанием кислорода. У взрослых животных подобные изменения после аналогичных воздействий гипо- и гипероксии были менее выражены [4].

## Заключение

Гипоксическая газовая смесь (10 % кислорода), подаваемая в прерывистом режиме, приводит к увеличению воздушности легких и общей площади альвеолярной поверхности, снижению количества элементов СТ, что способствует повышению эффективности газообмена.

Гипероксическая газовая смесь (40 % кислорода) в прерывистом режиме приводит к уменьшению на 20 % среднего диаметра, на 21 % — глубины, на 43 % — площади поперечного сечения альвеол, а также ширины входа в альвеолу. На 46 % возрастает толщина МП, на 10 % увеличивается количество коллагеновых волокон и концентрация общего оксипролина в легких. Это может свидетельствовать об увеличении массы СТ в респираторном отделе, ухудшении условий диффузии кислорода через аэрогематический барьер.

## Литература

1. Порівняльні дані про розповсюдженість хвороб органів дихання і медичну допомогу хворим на хвороби пульмонологічного та алергологічного профілю в Україні за

2008–2009 рр. / Линник М.І., Недоспасова О.П., Антонечко Л.Ф. та ін. Київ; 2010.

2. Есипова И.К. Патологическая анатомия легких. М.: Медицина; 1976.
3. Березовський В.Я., Янко Р.В., Чака О.Г. та ін. Вплив гіпоксичної газової суміші саногенного рівня на реактивність легень щурів різного віку. Вісник Львівс. ун-ту. Сер. біол. 2012; (59): 227–234.
4. Коваленко Т.Н. Состояние аэрогематического барьера легких в условиях нормальной и измененной газовой среды у крыс разного возраста: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киев; 1984.
5. Розова К.В. Вплив нормо- та гіпобаричної гіпоксії на ультраструктуру тканини легень і міокарда. Фізіол. журн. 2008; 54 (2): 63–68.
6. Mascaretti R.S., Mataloun M.M., Dolhnikoff M. et al. Lung morphometry, collagen and elastin content: changes after hyperoxic exposure in preterm rabbits. Clinics (Sao Paulo) 2009; 64 (11):1099–1104.
7. Окуяма К., Джуанг Д., Айхара К. Ультраструктурные изменения в легких на фоне гипоксической терапии: оценка терапевтической эффективности как разновидности импульсной терапии. Пульмонология 2004; (4): 67–71.
8. Березовский В.А. Природная и инструментальная оротерапия. Донецк: Заславський; 2012.
9. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. Київ: Інформаційно-аналітичне агентство; 2011.
10. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит; 2010.
11. Вейбель Э.Р. Морфометрия легких человека: Пер. с нем. М.: Медицина; 1970.
12. Kurt R.S., Maria G.F. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. Circ. Res. 2006; 99: 675–691.
13. Widmaier E.P., Raff H., Strang K.T. Human physiology: The mechanisms of body function. Boston: McGraw-Hill Higher Education; 2003.
14. Estrada K.D., Chesler N.C. Collagen-related gene and protein expression changes in the lung in response to chronic hypoxia. Biomech. Model. Mechanobiol. 2009; 8 (4): 263–272.
15. Falanga V., Zhou L., Yufit T. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. J. Cell. Physiol. 2002; 191 (1): 42–50.
16. Fu Y.Q., Liu C.J., Li J. et al. The expression of a-smooth muscle actin during the lung injury induced by hyperoxia. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 2012; 24 (10): 616–619.
17. Jiang J.S., Lang Y.D., Chou H.C. et al. Activation of the renin-angiotensin system in hyperoxia-induced lung fibrosis in neonatal rats. Neonatology 2012; 101 (1): 47–54.

## Інформація об авторах

Березовский Вадим Акимович — д. м. н., проф., зав. отделом клинической патофизиологии Института физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины; тел. / факс: (044) 256-24-95; e-mail: vadber@biph.kiev.ua  
 Янко Роман Васильевич — к. б. н., младший научный сотрудник отдела клинической патофизиологии Института физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины; тел.: (044) 256-24-77; e-mail: biolag@ukr.net  
 Чака Елена Георгиевна — к. б. н., младший научный сотрудник отдела клинической патофизиологии Института физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины; тел.: (044) 256-24-77; e-mail: lenchaka@ukr.net  
 Литовка Ирина Георгиевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник отдела клинической патофизиологии Института физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины; тел.: (044) 256-25-02; e-mail: litir@biph.kiev.ua

Поступила 22.03.13  
 © Коллектив авторов, 2013  
 УДК 616.24-085.835.3