

УДК: 612.273:611.24

**ВПЛИВ ГІПОКСИЧНОЇ ГАЗОВОЇ СУМІШІ САНОГЕННОГО РІВНЯ НА
РЕАКТИВНІСТЬ ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ**

В. Березовський, Р. Янко*, О. Чака, І. Літовка, Т. Заморська

*Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України
вул. Богомольця, 4, Київ 01024, Україна
e-mail: biolag@ukr.net*

Досліджували вплив гіпоксичної газової суміші (ГГС) (10% кисню) на морфометричні зміни респіраторного відділу та на стан сполучної тканини в легенях щурів різного віку. Отримані морфометричні та біохімічні дані у 3-місячних тварин, що зазнавали впливу ГГС, можуть вказувати на збільшення загальної площі альвеолярної поверхні, посилення ферментативного руйнування новосинтезованого колагену, можливе зростання кровонаповнення легень, що сприяє збільшенню ефективності газообміну. У 12-місячних дослідних тварин було відзначено вірогідне зменшення товщини міжальвеолярної стінки та концентрації загального оксипроліну, що може вказувати на зниження відносного вмісту колагенових волокон, а тим самим і сполучної тканини в легенях.

Ключові слова: гіпоксична газова суміш, легені, сполучна тканина.

Тканина легень являє собою велику клітинну систему, що спеціалізується на виконанні багатьох фізіологічних функцій, основною з яких є газообмін. Легені також беруть участь у секреторно-видільній функції, обміні речовин (водному, ліпідному та сольовому), що має значення в підтримці кислотно-лужної рівноваги в організмі [15]. Хвороби органів дихання залишаються найбільш розповсюдженими та стоять на третьому місці причин смертності у структурі захворюваності населення України. З кожним роком кількість патології органів дихання збільшується. Так, якщо у 2006 р. за офіційною статистикою захворюваність органів дихання в Україні в середньому становила 16 741,5 на 100 тис. дорослого населення (18–100 років), то в 2010 р. цей показник підвищився до 17 896,4 [6]. Техногенне забруднення довкілля, паління призводять до виникнення та поширення хвороб органів дихання, зокрема фіброзу легень. Розростання сполучної тканини в легенях деформує бронхи, ущільнює легеневу тканину, сповільнює процеси газообміну.

Одним із методів нормалізації фізіологічних функцій легень може бути застосування газових сумішей із дозованим зниженням парціального тиску кисню. Відомо, що залежно від вмісту кисню газова суміш може здійснювати як патогенну, так і саногенну дію [1]. Результати застосування гіпоксичних газових сумішей (ГГС) саногенного рівня свідчать про поліпшення функціональної діяльності різних органів і систем організму [1, 8, 16]. Проте однозначної думки стосовно використання ГГС у лікуванні патології легень не існує. Це може бути пов'язано з використанням авторами ГГС із різним вмістом кисню, режимом подачі газової суміші, проведенням експериментів на тваринах різних вікових груп тощо.

Метою нашої роботи було дослідити зміни деяких морфометричних показників респіраторного відділу та маркерів стану колагену в легенях щурів різних вікових груп під впливом гіпоксичної газової суміші саногенного рівня.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 48 білих лабораторних щурах-самцях лінії Wistar, віком 3 і 12 міс. Щурів контрольних і дослідних груп утримували на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води і корму. Було сформовано 2 контрольних і 2 дослідних групи тварин: I і III групи – 3- та 12-місячні контрольні тварини, II і IV групи – 3- та 12-місячні щури, які зазнавали впливу гіпоксичної газової суміші (ГГС). Щурів, що зазнавали впливу зниженого парціального тиску кисню, розміщували в герметичній камері, в яку за допомогою мембранного газорозподільного елемента подавали нормобаричну гіпоксичну газову суміш (10% кисню в азоті) протягом 30 хв щодня. Тривалість експерименту становила 28 діб.

Виведення тварин з експерименту проводили під ефірним наркозом, з дотриманням міжнародних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.).

По закінченню експерименту відбирали зразки тканини легень для гістоморфологічного та біохімічного досліджень. Гістологічні препарати виготовляли за стандартною методикою: зразки тканини фіксували в рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, заливали у парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном і еозином та 2% кислим пікрофуксином у поєднанні з залізним гематоксиліном Вейгерта (модифікований метод забарвлення сполучної тканини за Ван-Гізоном) [4]. Мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Olympus» (Японія). На цифрових зображеннях здійснювали цитоморфометрію за допомогою комп'ютерної програми «IMAGE J».

На гістологічних зрізах вимірювали ширину, глибину та площу альвеол, визначали ширину входу в альвеолу, вимірювали товщину міжальвеолярної перегородки, діаметр респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів і мішечків. Визначали відношення ширини входу в альвеолу до її глибини та відношення діаметра респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів і мішечків до подвійної глибини альвеоли. На підставі вимірювань здійснювали загальний аналіз тканини легень [3].

Після декапітації виділені легені відмивали в фізіологічному розчині від залишків крові. За методом Т. П. Кузнецової та співавторів визначали концентрацію загального та вільного оксипроліну в тканині легень [5].

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за критерієм t Стьюдента. Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0 for Windows та програми Microsoft Excel 2003.

Результати і їхнє обговорення

Виявлена розбіжність у зміні маси тіла та легень молодих і дорослих тварин при впливі ГГС. Так, у 3-місячних щурів як контрольних, так і дослідних груп спостерігали тенденцію до збільшення маси тіла, а у 12-місячних тварин, навпаки, – до зменшення. Маса легень у 3-місячних щурів, які дихали ГГС, не відрізнялась від маси легень контрольної групи, тоді як у 12-місячних дослідних тварин маса легень була на 19% меншою ніж у контролі. Легеневий індекс (відношення маси легень до маси тіла) після впливу ГГС у 3-місячних щурів був на 8% більшим, а у 12-місячних тварин, навпаки, – на 14% меншим ніж у контролі (табл. 1).

Респіраторний відділ легень представлений респіраторними бронхіолами, альвеолярними ходами, альвеолярними мішечками й альвеолами. Останні перебувають

у нормальному стані, частина – у стані фізіологічного ателектазу, частина – помірно розширена (рис. 1).

Таблиця 1

Маса легень і легеневий індекс щурів контрольних та дослідних груп (M±m; n=12)

Показники	3-місячні щури		12-місячні щури	
	Контроль	Гіпоксична газова суміш	Контроль	Гіпоксична газова суміш
Маса легень, г	2,4±0,13	2,5±0,12	2,7±0,31	2,4±0,2
Легеневий індекс, %	0,75	0,81	0,73	0,63

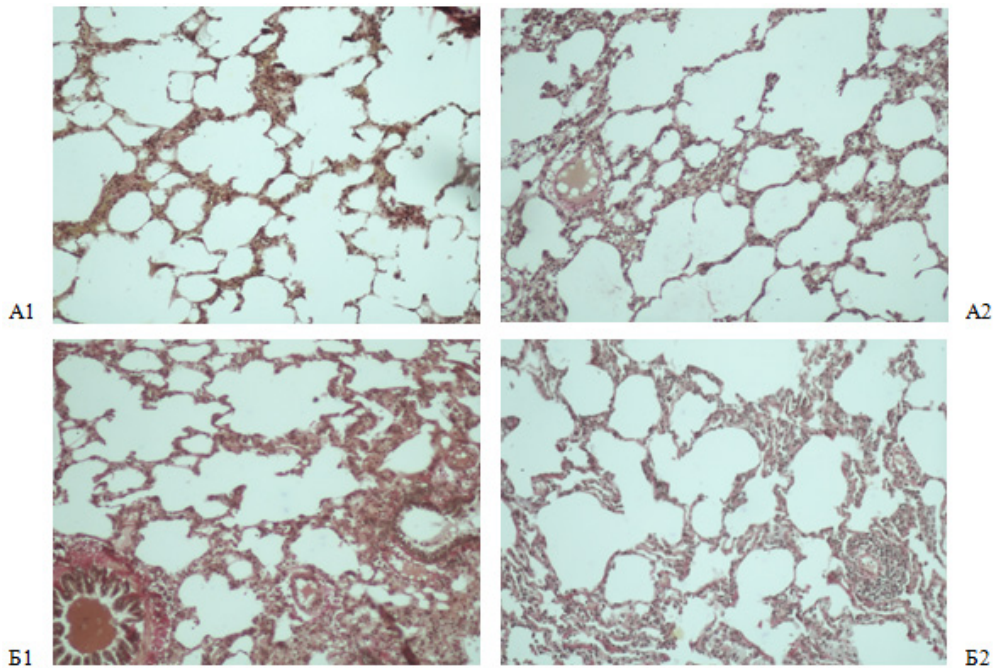


Рис. 1. Мікрофотографія легень 3-місячної (A1) і 12-місячної (B1) інтактної тварини та 3-місячного (A2) і 12-місячного (B2) щура, який зазнавав впливу гіпоксичної газової суміші. Забарвлення 2% кислим пікрофуксином у поєднанні з залізним гематоксилином Вейгерта. $\times 100$.

У щурів 3-місячного віку, що зазнавали впливу ГГС, при морфометрії спостерігали підвищення ширини поперечного перерізу альвеол на 19% ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Середня глибина альвеоли дослідних груп тварин мала тенденцію до збільшення (на 9%). Водночас відзначали збільшення ширини входу в альвеолу на 25% у тварин, які щоденно дихали ГГС тривалістю 30 хв протягом 28-ми діб. При цих же умовах підвищується відношення ширини входу в альвеолу до її глибини на 14% порівняно з контролем. Ці зміни свідчать про збільшення загального об'єму альвеол і площі альвеолярної поверхні, що сприяє підвищенню ефективності газообміну (табл. 2).

У тварин 12-місячного віку, що зазнавали впливу ГГС, на відміну від молодих тварин, були отримані дещо інші результати. Так, у дорослих щурів виявлена тенденція до зниження середньої ширини та глибини альвеоли. Виявлено вірогідне зниження ширини входу в альвеолу (на 20%) порівняно з контролем. Відповідно знижувалося співвідношення ширини входу в альвеолу до її глибини (табл. 2).

На гістологічних зрізах важко чітко визначити структурні відмінності між альвеолярними ходами і мішечками. Також не завжди вдається відрізнити периферичні бронхіоли від альвеолярних ходів. Тому їх прийнято розглядати як одну групу [3]. Просвіт респіраторних бронхіол (РБ), альвеолярних ходів (АХ) та мішечків вільний. Десквамації альвеолярного епітелію не відзначено. Ширина РБ, АХ та мішечків у 3- та 12-місячних тварин, що зазнавали впливу ГГС, не мала вірогідних відмінностей від контрольних значень. Відношення діаметра РБ, АХ та мішечків до подвійної глибини альвеоли мало тенденцію до зниження порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2

Морфометричні показники респіраторного відділу легень 3- та 12-місячних щурів контрольних і дослідних груп (M±m; n=12)

Показники	3-місячні щури		12-місячні щури	
	Контроль	Гіпоксична газова суміш	Контроль	Гіпоксична газова суміш
Ширина альвеоли, мкм	43,4±1,95	51,7±2,74*	45,8±1,89	43,7±2,35
Глибина альвеоли, мкм	46,7±2,78	50,9±2,79	46,3±2,87	42,7±2,35
Ширина входу в альвеолу, мкм	30,3±1,8	37,9±2,33*	32,6±1,79	26,2±1,85*
Площа альвеоли, мкм ²	2996±227	3112±295	2754±205	2750±177
Ширина респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів та мішечків, мкм	105±5,79	103±5,33	116±7,46	104±4,32
Відношення ширини входу в альвеолу до її глибини	0,65±0,039	0,74±0,066	0,7±0,04	0,61±0,04
Відношення діаметра респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів та мішечків до подвійної глибини альвеоли	1,12±0,09	1,01±0,08	1,25±0,11	1,22±0,08

Примітка. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем.

Складовою частиною всіх органів, у тому числі й легень, є сполучна тканина (СТ). Вона створює умови для повноцінної діяльності альвеолоцитів I та II типу. СТ легень зумовлює еластичність органа, що необхідно для екскурсії тканини у процесі дихання та стимуляції руху міжклітинної рідини. В цілому організмі вона забезпечує інтеграцію різних органів і тканин у єдине ціле [15].

Сполучна тканина бере активну участь у патологічних процесах і впливає на їхній перебіг і результат. При пошкодженні легень різними фізичними чи хімічними факторами відбувається її розростання. У цьому процесі важливого значення набувають фібробласти, що мають високу активність синтезу, та гістіоцити, які виконують захисну роль. Фібробласти максимально активно проліферують у місці пошкодження легень, синтезуючи колаген та вуглеводно-білкові макромолекули – органічний матрикс [13, 14].

При забарвленні гістологічних препаратів легень 2% кислим пікрофуксином у поєднанні з залізним гематоксилином Вейгерта (модифікований метод забарвлення сполучної тканини зв Ван-Гізеном) було відзначено, що найбільша кількість колагенових волокон розташована навколо респіраторних бронхіол, кровоносних судин, меншою мірою – в міжальвеолярних стінках. У 12-місячних інтактних щурів візуалізується більша кількість колагенових волокон, ніж у 3-місячних тварин (рис. 1). **Це пов'язано з тим, що з віком змінюється співвідношення колагенових і еластинових волокон, що погіршує функціональну властивість тканини легень.**

Середня товщина міжальвеолярної перетинки у 3-місячних тварин контрольної групи становила 5,5 мкм. Після впливу ГГС товщина міжальвеолярної перетинки зросла на 25% (P<0,05) порівняно з контролем (рис. 2). **Збільшення середньої товщини між-**

альвеолярної перетинки, можливо, пов'язано з повнокрів'ям капілярів судинного русла. Адже відомо, що дихання ГГС збільшує кровонаповнення та прискорює мікроциркуляцію в органах і тканинах за рахунок розкриття резервних капілярів, а також утворення нових, раніше не існуючих судин [1].

Товщина міжальвеолярної перетинки у тварин 12-місячного віку контрольної групи становила 7 мкм, що на 27% більше від даного показника у інтактних 3-місячних щурів. Дихання ГГС у дорослих тварин, на відміну від молодих щурів, зменшувало товщину міжальвеолярної перетинки на 17% ($P < 0,05$) (рис. 2).

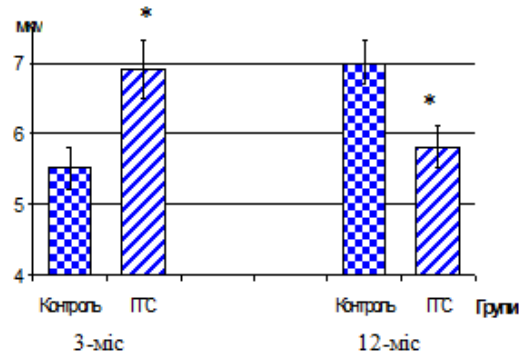


Рис. 2. Товщина міжальвеолярної перетинки контрольних і дослідних груп тварин. * $P < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем.

Вимірювання концентрації оксипроліну, який становить 10% від загального вмісту амінокислот, що входять у структуру колагену, часто використовують для оцінки стану СТ. У наших дослідженнях вміст загального оксипроліну в легенях 3-місячних щурів, які зазнавали впливу ГГС, залишався на контрольному рівні. Водночас у 12-місячних тварин після впливу дозованої гіпоксії концентрація загального оксипроліну вірогідно зменшилась на 23% порівняно з контролем (рис. 3). Зменшення концентрації загального оксипроліну може свідчити про зниження відносного вмісту колагенових волокон (внаслідок посилення деструкції або гальмування їх новоутворення) [9].

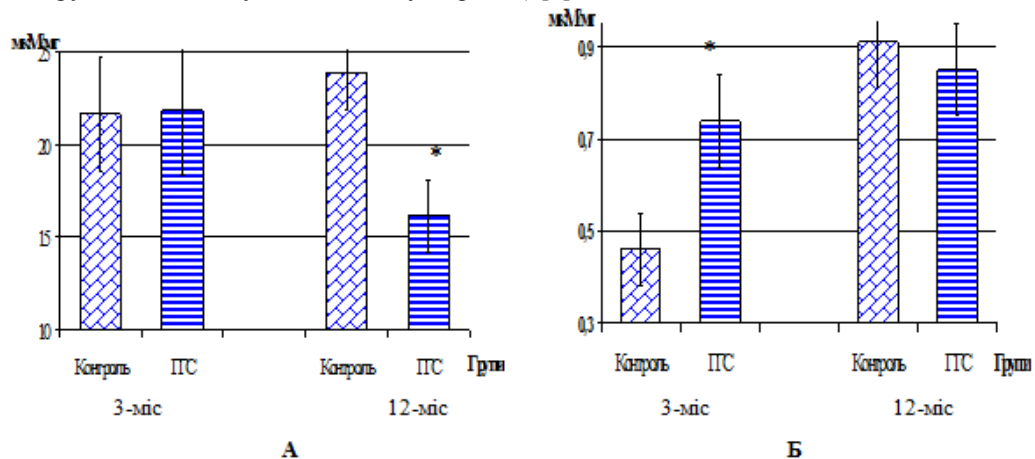


Рис. 3. Концентрація загального (А) та вільного (Б) оксипроліну в тканині легень контрольних і дослідних груп. * $P < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем.

Концентрація вільного оксипроліну вірогідно підвищилась (на 60%) лише у 3-місячних тварин, які дихали ГГС. У дослідній групі 12-місячних щурів концентрація вільного оксипроліну залишалася на рівні контролю (рис. 3). У процесі біосинтезу колагену оксипролін утворюється шляхом окислення пептидозв'язаних залишків проліну. Вільний оксипролін не залучається у склад поліпептидного ланцюга колагену. Збільшення концентрації вільного оксипроліну в легенях (при відсутності змін у концентрації загального оксипроліну) може свідчити про посилення катаболізму колагенових фібрил [7].

Дослідження впливу гіпоксії саногенного рівня на сполучну тканину легень здійснювались і іншими дослідниками. Так, показано збільшення експресії генів колагену та фактора росту в тканині легень під впливом гіпобаричної [11] та нормобаричної гіпоксії [10]. V. Falanga із співавторами показав, що концентрація загального колагену, яку визначали по вмісту оксипроліну, збільшувалась тільки в умовах гіпобаричної гіпоксії, а під впливом нормобаричної гіпоксії – залишалася без змін [12]. Проте у цих дослідженнях не диференціювались саногенні та патогенні властивості гіпоксії.

З отриманих нами цитоморфометричних і біохімічних даних можна зробити висновок, що газова суміш, яка містить 10% кисню, по-різному впливає на тканину легень молодих і дорослих щурів. Так, у 3-місячних тварин після впливу газової суміші виявлено зростання ширини, глибини альвеоли, ширини входу в альвеолу, підвищення концентрації вільного оксипроліну, що може вказувати на збільшення загальної площі альвеолярної поверхні, посилення ферментативного руйнування новосинтезованого колагену. Збільшення товщини міжальвеолярної стінки у молодих тварин після впливу гіпоксії можливе за рахунок підвищення кровонаповнення легень. У 12-місячних тварин після впливу гіпоксичної суміші відзначено незначне зменшення ширини, глибини альвеоли, ширини входу в альвеолу, діаметра респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів і мішечків. Знижувались і товщина міжальвеолярної перетинки та концентрація загального оксипроліну. Це може вказувати на зменшення відносного вмісту колагену і сполучної тканини.

У минулому столітті відомий французький дослідник онтогенетичних змін людини Бурльєр встановив, що інтенсивність споживання кисню в юнацькому періоді розвитку людини підвищується, досягаючи максимуму у 25–30 років. Після цього починається повільний дрейф споживання кисню до мінімального рівня (з чим пов'язують зменшення теплопродукції організму старечого віку) [2]. Не виключено, що залежна від інтенсивності споживання кисню межа саногенної дії дозованої гіпоксії з віком змінюється. Звідси випливає необхідність у відповідній віковій корекції дозування впливу гіпоксичної газової суміші.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Березовский В. А., Левашов М. И. Введение в оротерапию. 2-е изд. М.: Изд-во Академии проблем гипоксии РФ, 2000. 76 с.
2. Бурльер Ф. Старение и старость. М.: Наука, 1992. 125 с.
3. Вейбель Э. Р. Морфометрия легких человека. М.: Медицина, 1970. 175 с.
4. Волкова О. В., Елецкий Ю. К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина, 1982. 304 с.
5. Кузнецова Т. П., Прошина Л. Я., Приваленко М. Н. Модификация определения оксипролина в сыворотке крови // Лабораторное дело. 1982. № 8. С. 8–10.
6. Линник М. І., Недоспасова О. П., Антонечко Л. Ф. та ін., Порівняльні дані про розповсюдженість хвороб органів дихання і медичну допомогу хворим на хвороби пульмонологічного та алергологічного профілю в Україні за 2008–2009 рр. Київ, 2010. 48 с.

7. Поливанов Т. В., Манчук В. Т. Морфофункциональные параметры коллагена в норме и патологии // Успехи соврем. естествознания, 2007. № 2. С. 25–30.
8. Стрелков Р. Б., Чижев А. Я. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. Екатеринбург: Урал. рабочий, 2001. 397 с.
9. Узленкова Н. Е., Мамотюк Е. М., Гусакова В. А., Кононенко О. К. Биохимические и морфологические изменения в ткани легких крыс под влиянием внешнего ионизирующего излучения // Укр. радиолог. журн. 200. Т. 24. № 4. С. 432–438.
10. Berg T. J., Breen C. E., Zhenxing F. et al. Alveolar Hypoxia Increases Gene Expression of Extracellular Matrix Proteins and Platelet-derived Growth Factor-B in Lung Parenchyma // *Am. J. Respir Crit Care Med.* 1998. Vol. 158. N 6. P. 1920–1928.
11. 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. Vol. 8. N 4. P. 263–272.
12. 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. Vol. 191. N 1. P. 42–50.
13. Flavia V., Castelino V., John V. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management // *Arthritis Research & Therapy.* 2010. Vol. 12. P. 210–213
14. Gadek J. E., Fells G. A., Zimmerman R. L., Crystal R. G. Role of connective tissue proteases in the pathogenesis of chronic inflammatory lung disease // *Environ. Health Perspect.* 1984. Vol. 55. P. 297–306.
15. Widmaier E. P., Raff H., Strang K. T. Human physiology: The mechanisms of body function. The McGraw-Hill Companies, 2003. 826 p.
16. Yanko R. V. Physiological regeneration and functional activity of hepatocytes at normobaric hypoxia // *Inter. J. Physiol. Pathophysiol.* 2011. Vol. 2. N 1. P. 35–42.

Стаття: надійшла до редакції 20.03.12

прийнята до друку 12.04.12

THE HIPOXIC GAS MIXTURE OF LEVEL SANOGENE EFFECTS ON LUNGS REACTIVITY THE RATS OF DIFFERENT AGE

V. Berezovskiy, R. Yanko*, O. Chaka, I. Litovka, T. Zamorska

*Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine
4, Bogomolets St., Kiev 01024, Ukraine
e-mail: biolag@ukr.net*

We have investigated the influence of hipoxic gas mixture (HGM) (10% oxygen) on the morphometric indexes of respiratory section and on the state of connecting tissue of the lungs among the rats of different age. Morphometric and biochemical data that were recieved from 3-mounts animals, which breathed HGM, can indicate the increase of general volume alveolar surfac's area and intensification of fermentative destruction of new synthesized collagen, possible increase of the lungs blood filling, which facilitate the efficiency of gases interchange. Among 12-mounts rats was observed decrease in the thickness of interalveolar partitions and concentration of general oxyproline, that can point to the decline of relative collagen fibres content.

Keywords: hipoxic gas mixture, lungs, connecting tissue.

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГАЗОВОЙ СМЕСИ САНОГЕННОГО УРОВНЯ НА РЕАКТИВНОСТЬ ЛЕГКИХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА**В. Березовский, Р. Янко*, Е. Чака, И. Литовка, Т. Заморская**

*Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины
ул. Богомольца, 4, Киев 01024, Украина
e-mail: biolag@ukr.net*

Исследовали влияние гипоксической газовой смеси (ГГС) (10% кислорода) на морфометрические изменения респираторного отдела и на состояние соединительной ткани легких крыс разного возраста. Полученные морфометрические и биохимические данные у 3-месячных животных, которые испытывали влияние ГГС, могут указывать на увеличение общей площади альвеолярной поверхности, усиление ферментативного разрушения новосинтезированного коллагена, возможный рост кровенаполнения легких, которое способствует увеличению эффективности газообмена. У 12-месячных опытных животных было отмечено достоверное уменьшение толщины межальвеолярной стенки и концентрации общего оксипролина, что может указывать на снижение относительного содержания коллагеновых волокон, а следовательно – соединительной ткани в легких.

Ключевые слова: гипоксическая газовая смесь, легкие, соединительная ткань.