

УДК 591.424:612.273.2

А.Д. Таганович, С.Л. Анищенко, И.Л. Котович, Ж.А. Рутковская  
СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ МОР-  
СКИХ СВИНОК, ПОДВЕРГНУТЫХ ГИПЕРОКСИИ

Белорусский государственный медицинский университет

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) представляет собой хроническое легочное заболевание, которое развивается у недоношенных детей, получающих лечение кислородом путем вентиляции легких положительным давлением [1,2]. Для БЛД характерны снижение эластичности легочной ткани, увеличение динамического сопротивления дыхательных путей, длинная временная константа, увеличение анатомического мертвого пространства и увеличение функциональной остаточной емкости легких (вследствие эмфиземы), аномальное вентиляционно-перфузионное соотношение, повышенная реактивность бронхов, обструкция бронхов и, как следствие вышеназванного – нарушенный газообмен, низкий дыхательный объем, увеличение частоты дыхания, низкое парциальное давление  $O_2$ , накопление  $CO_2$  [3,4].

Вероятность развития БЛД зависит от гестационного возраста и массы тела новорожденного. Чем меньше гестационный возраст и вес при рождении, тем чаще у детей развивается БЛД [1,4]. При этом в качестве этиопатогенетических факторов выступают высокая концентрация кислорода, баротравма и волюмотравма при проведении ИВЛ, отек легочной ткани вследствие избыточного введения в организм жидкости, незрелость сурфактантной системы, нарушение баланса образования активных форм кислорода и их катаболизма [1,5,6].

Данной проблеме посвящены многочисленные публикации клинического и экспериментального характера [2,3,4,5,6,7,8]. Проведение, в частности, экспериментальных исследований дает уникальную возможность изучения молекулярных событий, происходящих в легочной ткани на этапах формирования БЛД, а также отработки и обоснования моделей новых методов лече-

ния этой патологии. Однако всегда присутствует понимание того, что моделирование БЛД не может полностью воспроизвести условий формирования этого состояния у человека. Во-первых, имеют место различия организма человека и экспериментального животного. Экспериментальные исследования проводились и проводятся на разных животных (мыши, крысы, обезьяны и др.), которые выдерживались в течение различного времени при разной концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе. Во-вторых, в большинстве экспериментальных моделей используются новорожденные животные, которые родились в срок, в то время как в клинической практике БЛД чаще развивается у недоношенных новорожденных, находившихся на ИВЛ. То есть, в расчет должна приниматься разная степень незрелости легочной ткани, при которой изучается формирование БЛД.

Приведенные обстоятельства должны учитываться при проведении экспериментальных исследований. В частности, обязательным является контроль морфологических изменений в легочной ткани. Только обнаружение структурных изменений, схожих с имеющимися при БЛД, как представляется, дает основание причислить любые другие находки к свойственным именно для этой патологии.

Руководствуясь подобными рассуждениями, мы предприняли исследование по созданию метода профилактики и лечения БЛД. Для этого использовалась экспериментальная модель, в основе которой лежала гипотеза о ведущей роли гипероксии в развитии повреждения легких новорожденных [9,10]. Поэтому целью данной работы явилось выявление структурных изменений в легких новорожденных морских свинок, подвергнутых контролируемой гипероксии, чтобы сопоставить их с теми, которые другие исследователи обнаруживали в эксперименте и у недоношенных новорожденных детей, находившихся на ИВЛ.

#### Материал и методы исследования

Эксперимент проводили на новорожденных морских свинках, матери которых находились на стандартном рационе вивария УО «БГМУ». При ра-

боте с экспериментальными животными соблюдали правила, изложенные в «Положении о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете».

В первые сутки после рождения животных опытной группы помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% (температура 20-25°C, относительная влажность 50–80%). Концентрацию кислорода в камере контролировали с помощью анализатора кислорода ПГК-06-100Р (ЗАО «Инсофт», РФ). Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 1, 3, 7 и 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали комнатным воздухом при температуре 22<sup>0</sup>С. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных. По окончании инкубации животных обеих групп выводили из эксперимента путем внутрибрюшинной инъекции дозы тиопентала натрия (15 мг/кг) и выделяли легкие для исследования.

Легкие разрезали во фронтальной плоскости на тканевые блоки с интервалом 3 мм. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили через спирты возрастающей концентрации, хлороформ и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону и исследовали при помощи светового микроскопа «Axioscop 40» (Karl Zeiss, ФРГ).

Для получения количественных показателей состояния легочной ткани был использован морфометрический метод исследования. Проводилась фотосъемка гистологических препаратов цифровой камерой DFC 425 (Leica, ФРГ), подключенной к световому микроскопу DM 2500 (Leica, ФРГ) при 200 и 400-кратном увеличении. Формат изображения составил 2592x1944 и 3888x2916 пикселей, соответственно. Полученные цифровые фотографии импортировали в электронный анализатор изображения – программу Photo M 1.31 [11].

Морфологию легких изучали с количественной оценкой структурно-функциональных компонентов респираторной зоны: определяли суммарную площадь просвета альвеол, суммарную площадь межальвеолярных перегородок (с капиллярами) и эпителия альвеол, а также площадь просвета сосудов артериального русла (артериол) – в  $\text{мкм}^2$ . Для иллюстрации оценивалась также доля измеряемых параметров относительно площади всего поля зрения, которая выражалась в процентах. В каждом наблюдении было использовано не менее 10 не перекрывающихся между собой полей зрения.

Статистический анализ данных проводили при помощи программы VI-OSTATISTICA 4.03 [12]. Количественные данные, распределение которых было отличным от нормального, описывали при помощи медианы и процентильного размаха (25% и 75%). Сравнение двух выборок количественных данных, распределение которых было отличным от нормального, проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест). Статистически значимым считали результат, если вероятность отвергнуть нулевую гипотезу (об отсутствии различий) не превышала 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании спустя 1 сутки от начала эксперимента гистологическая картина легких у животных обеих групп существенно не различалась. Менее воздушной легочная ткань была в перибронхиальных отделах, более расправленной – в периферических отделах легких. Слизистая оболочка бронхов и бронхиол имела фестончатые очертания, была выстлана цилиндрическим и кубическим (в бронхиолах) эпителием респираторного типа со слабовыраженными десквамативными изменениями. Сосуды артериального русла имели толстую стенку, щелевидный или округлый просвет (длинная ось ядра эндотелиоцитов была ориентирована перпендикулярно базальной мембране). Отмечалось умеренное полнокровие капилляров межальвеолярных перегородок (рис.1, А,Б).

Таблица 1. Морфометрические показатели в легких новорожденных морских свинок, подвергнутых гипероксии

Экспериментальная группа животных	Площадь просвета альвеол			Площадь межальвеолярных перегородок и эпителия альвеол		
	Медиана (25%;75%), мкм <sup>2</sup>	%	P	Медиана (25%;75%), мкм <sup>2</sup>	%	P
1 Суток гипероксии:						
Контроль	11597,2 (11062,8;12219,0)	55,1	0,653	9466,7 (8844,9;10001,0)	44,9	0,650
Опыт	11837,7 (11240,3;12551,4)	56,2		9226,2 (8512,5;9823,5)	43,8	
3 Суток гипероксии:						
Контроль	10517,9 (10339,5;10716,7)	49,9	0,026	10545,9 (10347,2;10724,3)	50,1	0,050
Опыт	11700,1 (11323,6;12393,0)	55,6		9363,8 (8670,8;9740,3)	44,5	
7 Суток гипероксии:						
Контроль	10822,5 (10458,7;12027,1)	51,4	0,021	10241,4 (9687,8;10605,1)	48,6	0,021
Опыт	11773,6 (11375,7;12027,1)	55,9		9290,2 (9036,8;9688,2)	44,1	
14 Суток гипероксии:						
Контроль	11059,4 (10741,7;11362,7)	52,5	0,040	10004,5 (9701,2;10322,1)	47,5	0,040
Опыт	12528,2 (12103,7;12872,7)	59,5		8535,7 (8191,1;8960,1)	40,5	

Примечание: в столбце «%» приведены средние арифметические относительных (по отношению к площади поля зрения) площадей измеряемых параметров; во всех экспериментальных группах n (количество анализируемых срезов) = 10; P – результат проведения U-теста (Манна-Уитни) для абсолютных значений показателей.

Таблица 2. Суммарная площадь просвета артериол в срезах легких через 14 суток гипероксии

Экспериментальная группа животных	Медиана (25%;75%), мкм <sup>2</sup>	%	P
Контроль	20,7 (13,8;32,0)	0,2	0,001
Опыт	104,3 (81,5;155,9)	1,1	

При морфометрическом исследовании суммарной площади просвета альвеол в гистологических срезах легких опытных и контрольных животных через 1 сутки гипероксии достоверных различий выявлено не было. Значения морфометрического показателя – площади межальвеолярных перегородок и эпителия альвеол, в сравниваемых группах также существенно не различались.

Спустя 3 суток от начала эксперимента гистоструктура легких животных контрольной группы существенно не отличалась от таковой в предыдущем сроке наблюдения (через 1 сутки). В опытной группе по сравнению с контрольной легочная ткань выглядела более расправленной, воздушной, с очажками эмфиземы в виде групп растянутых альвеол с истонченными стенками. В отдельных альвеолах в участках мелкоочаговых ателектазов наблюдались скопления альвеолярных макрофагов.

Отмечалась слабовыраженная очаговая инфильтрация стромы клетками воспаления: мелкоочаговые инфильтраты из эозинофилов и лимфоцитов локализовались преимущественно периваскулярно и перибронхиально (рис.4 А).

Суммарная площадь просвета альвеол в препаратах опытной группы животных была статистически достоверно больше, чем в контроле. Площадь межальвеолярных перегородок и эпителия альвеол, как и доля их в единице площади среза, наоборот, статистически значимо уменьшались (таблица 1).

Через 7 суток у животных группы сравнения, дышавших комнатным воздухом, легкие были расправлены относительно равномерно, сохранялась складчатость слизистой оболочки бронхиол и мелких бронхов. По сравнению с предыдущими сроками эксперимента, несколько шире был просвет артериол, отмечалось умеренное венозное полнокровие и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла.

В опытной группе, по сравнению с группой контроля и предыдущим сроком наблюдения, респираторные отделы легких выглядели более рас-

правленными: часть бронхов и бронхиол имели сглаженный рельеф слизистой оболочки, часть сохраняли фестончатые очертания; отмечались десквамативные изменения респираторного эпителия. Чаще выявлялись очаги эмфиземы, располагавшиеся преимущественно субплеврально. В строме легких определялись мелкоочаговые инфильтраты из лимфоцитов и сегментоядерных лейкоцитов (рис. 2 А,Б).

Согласно результатам морфометрического исследования респираторных отделов легких спустя 7 суток эксперимента, суммарная площадь просвета альвеол была больше у животных, находившихся в условиях гипероксии ( $p = 0,021$ ). В то же время, площадь межальвеолярных перегородок и эпителия альвеол в срезах легких у животных опытной группы была существенно меньше, чем в контроле (таблица 1).

Через 14 суток наблюдения в препаратах контрольной группы сохранялись фестончатые очертания слизистой оболочки бронхов и бронхиол, преобладали артериолы с толстой стенкой, небольшим округлым или щелевидным просветом, наблюдалась относительно равномерная воздушность легочной ткани.

В опытной группе направленность изменений в легких была аналогична таковой на предыдущих этапах эксперимента, но они носили более выраженный характер. Наблюдалось расширение просвета, исчезновение складчатости слизистой оболочки мелких бронхов и бронхиол, увеличение просвета альвеол, в сочетании с уменьшением их количества в единице площади среза. Очажки эмфиземы определялись не только в субплевральных отделах, но и в перибронхиальных участках легких. Более отчетливым было расширение просвета артериол, длинная ось ядра эндотелиоцитов располагалась параллельно базальной мембране. В периваскулярных и перибронхиальных пространствах чаще встречались мелкоочаговые инфильтраты, представленные мононуклеарными клеточными элементами и сегментоядерными лейкоцитами (рис. 4 Б).

Согласно результатам морфометрического исследования суммарная площадь просвета альвеол у животных через 14 суток гипероксии, как и в предыдущие периоды (3 и 7 суток), существенно превышала таковую в контрольной группе. Различия площади межальвеолярных перегородок и эпителия альвеол в препаратах опытной группы животных по сравнению с контролем были достоверными.

Отмеченное на светооптическом уровне расширение просвета артериол у животных в условиях гипероксии было подтверждено результатами морфометрического исследования. Сопоставление суммарной площади просвета артериол в препаратах легких через 14 суток эксперимента показало резкое (в 5 раз) увеличение этого показателя в опытной группе по сравнению с контролем (таблица 2).

При окраске по Ван Гизону во всех сроках наблюдения в опытной и контрольной группах увеличения содержания коллагеновых волокон в стро-  
ме легких отмечено не было (рис.3, А,Б).

На всех этапах эксперимента у животных контрольной группы, дышавших комнатным воздухом, гистологическая картина легких выраженной динамики не претерпевала. У новорожденных морских свинок, находившихся в условиях гипероксии, существенные изменения в легочной ткани наблюдались уже через 3 суток от начала эксперимента. Они затрагивали все структурные элементы респираторных отделов легких и характеризовались эктазией просвета, сглаженностью рельефа слизистой, уплощением и частичной десквамацией эпителия и бронхиол, увеличением просвета артериол, слабовыраженной очаговой воспалительной инфильтрацией в интерстиции. Отмечалось уменьшение количества и увеличение просвета альвеол, истончение альвеолярных перегородок, формирование мелких фокусов ателектаза и очагов эмфиземы. По мере увеличения продолжительности эксперимента описанные изменения в опытной группе носили более выраженный характер.

Сходные результаты были получены в эксперименте на новорожденных мышам и крысах. Продолжительное воздействие высоких концентраций



(85%-95%) O<sub>2</sub> приводило к выраженным морфологическим изменениям в легких, характеризовавшимся упрощением ацинарной структуры со снижением количества альвеол и значительным увеличением размеров терминальных воздушных пространств, увеличением анатомически мертвого пространства в легких [5,8]. В гистологических срезах легких мышей, подвергавшихся гипероксии в эксперименте, наблюдались умеренно выраженные воспалительные изменения, которые были максимально выраженными через 2 недели гипероксии, а в дальнейшем уменьшались [8]. Как и в наших наблюдениях, клетки воспаления локализовались преимущественно в периваскулярных и перибронхиальных пространствах.

Изменения в легочной ткани, выявленные на светооптическом уровне, были подтверждены количественными методами исследования. Сравнительное морфометрическое исследование показало существенное увеличение суммарной площади просвета альвеол и уменьшение площади межальвеолярных перегородок и альвеолярного эпителия у животных опытной группы через 3, 7 и 14 суток от начала эксперимента. Обращают на себя внимание количественные перестройки артериол в срезах легких. Имело место резкое увеличение суммарной площади их просвета по сравнению с суммарной площадью просвета аналогичных сосудов в препаратах контрольной группы животных.

Аналогичные результаты были получены в других лабораториях. Так, искусственная вентиляция легких новорожденных мышей, в том числе, воздухом, содержащим 40% O<sub>2</sub>, в течение 24 ч, ингибировала образование альвеол и ангиогенез [13]. Характерной особенностью срезов легких новорожденных мышей, которые находились в течение 14 сут в условиях гипероксии (85% O<sub>2</sub>), являлось сниженное количество альвеол и увеличение просвета концевых отделов бронхов [4].

Отличительными признаками бронхолегочной дисплазии являются уменьшение количества и возрастающая вариабельность размеров альвеол, интерстициальный фиброз [1,2,8]. При исследовании гистологических препа-

ратов, окрашенных по Ван Гизону, во все сроки наблюдения нами не было отмечено увеличения содержания коллагеновых волокон в строме легких. Возможно, это было обусловлено продолжительностью эксперимента. Так, Warner B.B. e.a. [8] в эксперименте на мышах отмечали увеличение содержания коллагена в интерстиции легких после 2-х недель экспозиции кислорода с нарастанием в течение 4-х недель соответственно продолжавшейся гипероксии. Максимальная длительность нашего наблюдения составляла 2 недели.

Таким образом, в ходе проведенного экспериментального исследования нами были получены доказательства воздействия на легкие новорожденных морских свинок высокой концентрации кислорода (70%-80%) во вдыхаемом воздухе. К наиболее характерным выявленным морфологическим изменениям относятся упрощение ацинарной структуры, уменьшение количества и увеличение площади просвета альвеол, увеличение просвета артериол. Они становились заметными после 3 суток пребывания животных в таких условиях и сохранялись в более поздний период, через 7 и 14 суток.

Очевидным следствием таких изменений является повышенная воздушность, эмфизема и затрудненный газообмен в легких. Это соответствует известным составляющим бронхолегочной дисплазии, которой подвержены новорожденные дети с несостоятельной дыхательной функцией, находящиеся в течение длительного времени на управляемом дыхании. Значит использованные нами экспериментальные условия гипероксии позволяют адекватно моделировать состояние БЛД у новорожденных животных для последующего решения задач, связанных с выяснением механизма развития этого состояния, разработки методов его прерывания и предупреждения.

## Список литературы

1. Шишко Г.А., Устинович Ю.А. Современные подходы к ранней диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии : учебно-методическое пособие для врачей /.- Мн.: БелМАПО, 2006.
2. Цветкова, Ю. В. Патоморфологическая характеристика, морфогенез и морфологическая диагностика бронхолегочной дисплазии у новорожденных: Автореф. дис. к.м.н. – Челябинск, 2007.
3. Pulmonary Pathology / Ed. by Dail D. and Hammar S. – Springer-Verlag. – 1987.
4. Velten M., Heyob K.M., Rogers L.K., Welty S.E. // J Appl Physiol. – 2010, Vol. 108. – N.5. – p. 1347-1356.
5. Deng Hui, Manson S.N., Auten R.L. // Am J Respir Crit Care Med. – 2000, Vol. 162. – p. 2316-2323.
6. James M.L., Ross A.C., Bulger A., Philips J.B. III, Ambalavanan N. // Pediatr Res. – 2010, Vol.67. – N.6. – p.591-597.
7. Thebaud B., Abman S.H. // Am J Respir Crit Care Med. – 2007, Vol. 175. – p. 978-985.
8. Warner B.B., Stuart L.A., Papes R.A., Wispe J.R. // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 1998, Vol. 275. – pp 110-117.
9. Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д. // Весці Нацыянальнай акадэміі Навук Беларусі, сер. мед. навук № 4, 2011.- с. 16-23.
10. Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д. // Сб. науч. трудов «БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики», Минск, 2011, т.1.- с. 91
11. Cernigovskii, 2004; Электронный ресурс. <http://softok.org/soft/view-Photom.html>).

12. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. – М.: Практика, 1999.
13. Mokres L.M., Parai K., Hilgendorff A., Ertsey R., Alvira C.M., Rabinovitch M., Bland R.D. // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2010, Vol. 298, N 1. – pp. L23-L35.

Белорусский государственный медицинский университет, 220116 Минск, пр. Дзержинского, 83. Тел. 272 67 64

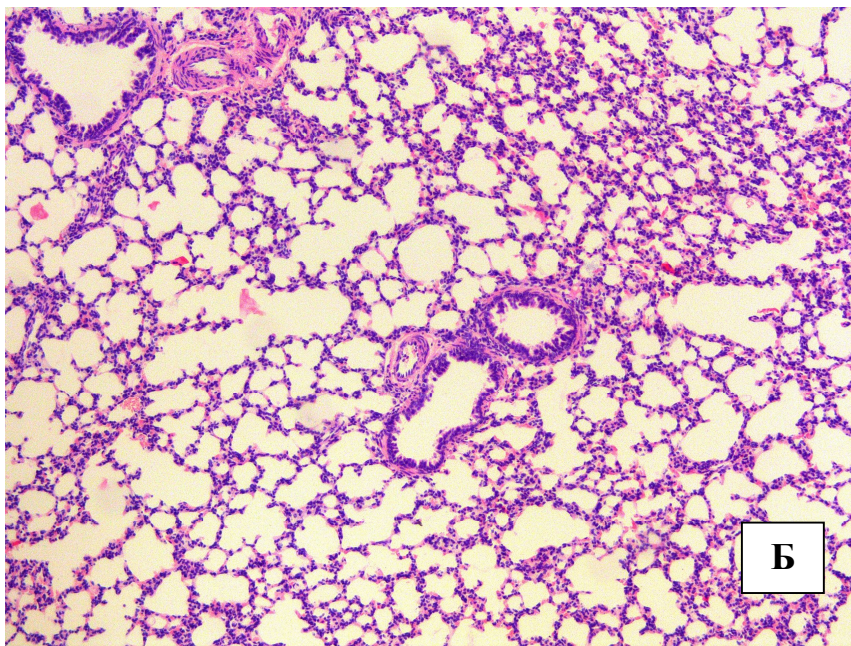
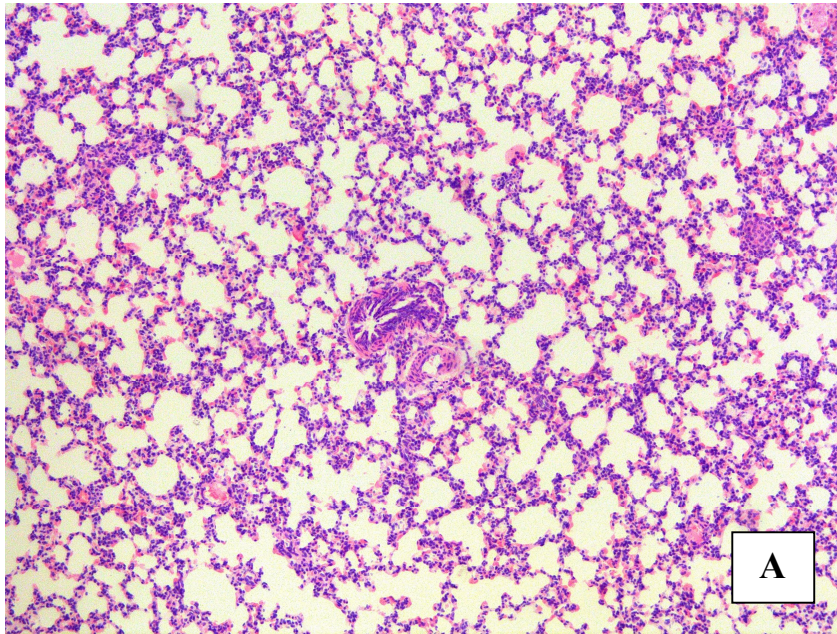


Рис. 1. Гистологическая картина легких животных контрольной (А) и опытной (Б) групп спустя 1 сутки от начала эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

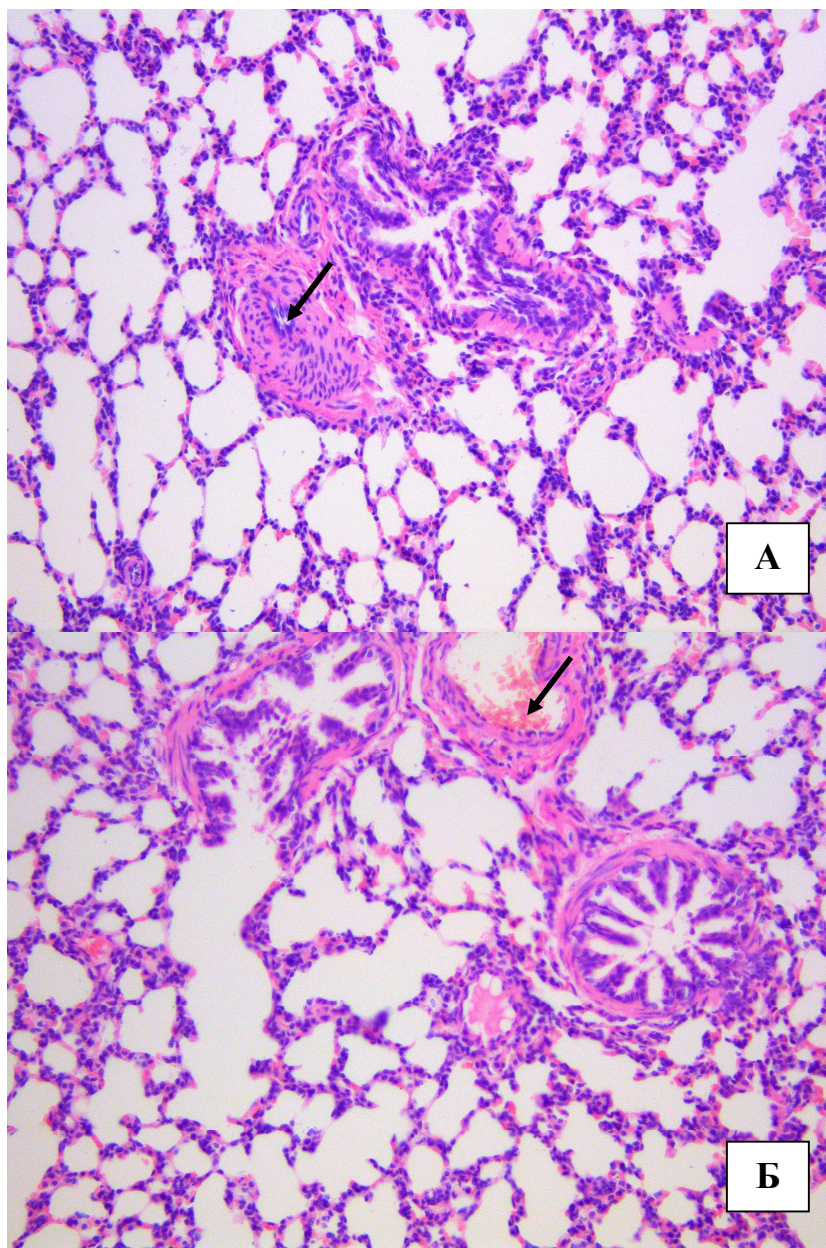


Рис. 2. Гистологическая картина легких через 7 суток от начала эксперимента. Увеличение просвета артерии в опытной (Б) группе по сравнению с контрольной (А) группой (указано стрелками). Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

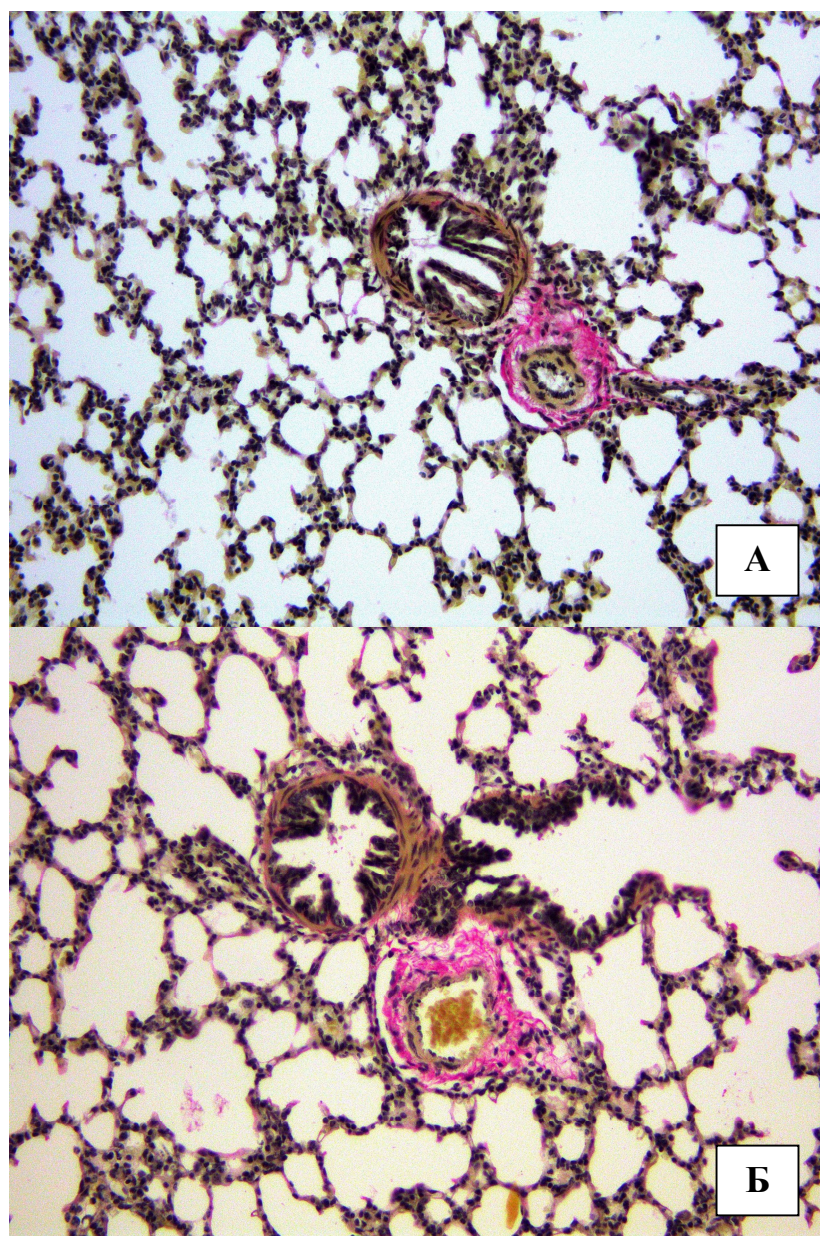


Рис 3. Гистологическая картина легких животных контрольной (А) и опытной (Б) группы через 14 суток эксперимента. У животных опытной (Б) группы отмечается расширение просвета артерий и бронхиол, уменьшение количества, снижение септации и увеличение просвета альвеол по сравнению с группой контроля (А). Окраска по Ван Гизону, x200.

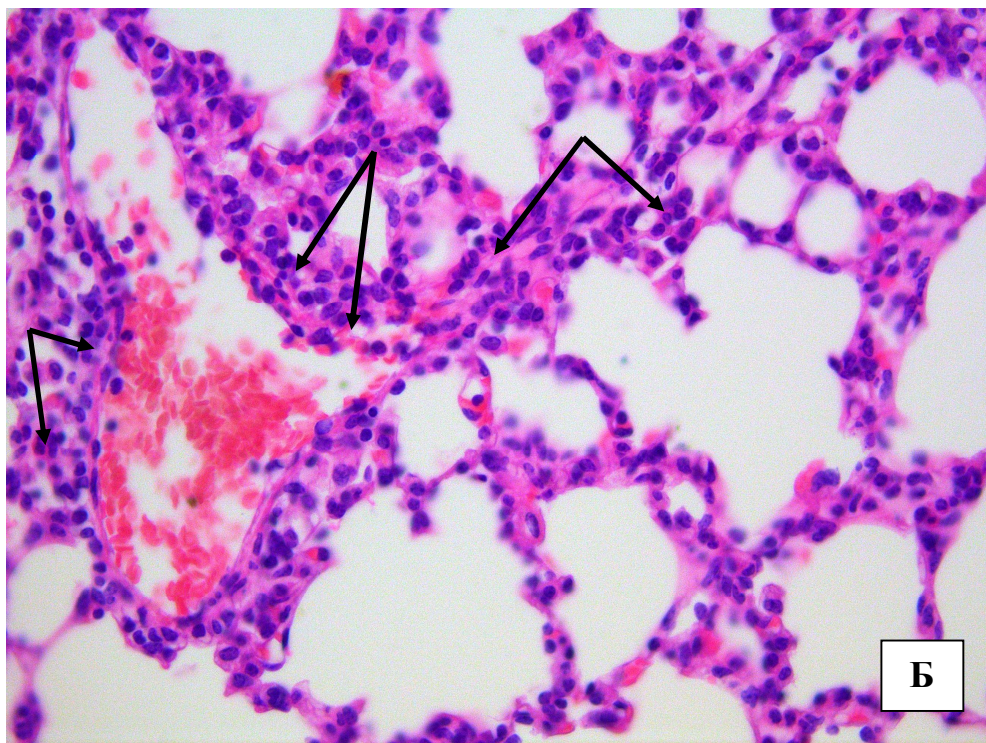
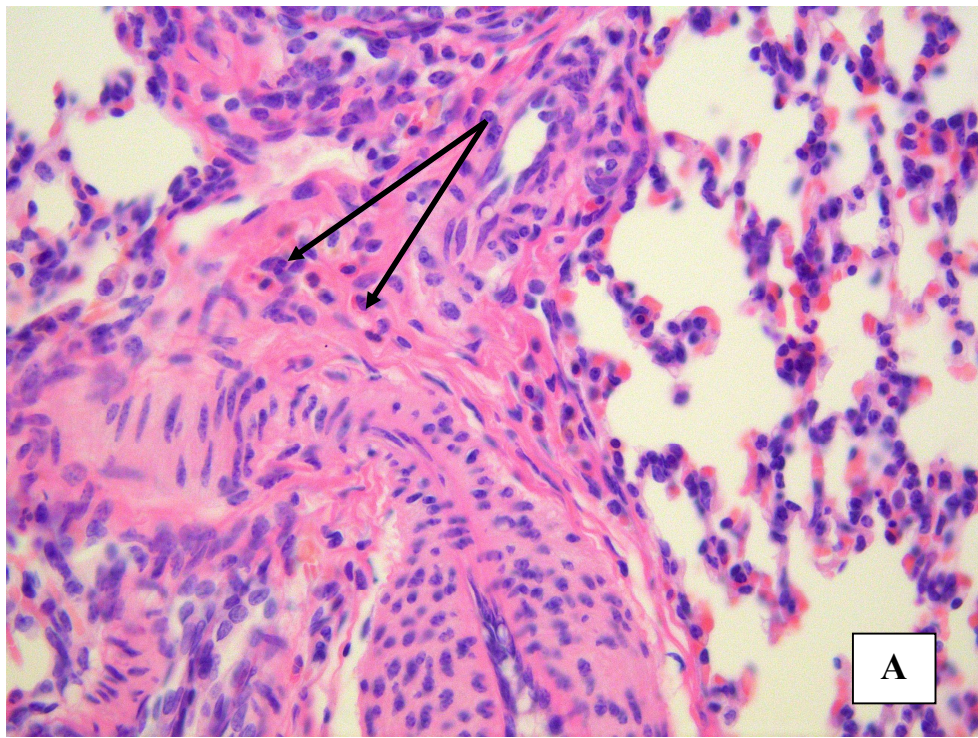


Рис. 4. Периваскулярная воспалительная инфильтрация в легочной ткани (указана стрелками) через 3 (А) и 14 суток (Б) от начала эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, х400.