

К.Окуяма ¹, Д.Джианг², К.Айхара ²

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛЕГКИХ НА ФОНЕ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ: ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КАК РАЗНОВИДНОСТИ ИМПУЛЬСНОЙ ТЕРАПИИ

¹ Клиническая исследовательская лаборатория терапии "Горным воздухом", Токио, Япония;

² Центральный институт электронно-микроскопических исследований,
Медицинская школа Ниппон, Токио, Япония

AN ULTRASTRUCTURAL OBSERVATION OF LUNGS TREATED BY THE HYPOXIC THERAPY: AN ASSESSMENT OF ITS THERAPEUTIC EFFICACY

AS ONE OF THE IMPULSE THERAPY

Kodo Okuyama, Jingtao Jiang, Kaoru Aihara

Summary

Intermittent hypoxic training (IHT) has been used for prevention and treatment of some diseases and for training athletes. In this study, we examined the morphological changes in lungs after IHT using light and electron microscopy. 39 male Wistar rats were sustained intermittent hypoxic training (10 % O₂) for 5 min three times a day with 5-min rebreathing intervals or 15, 30, 60 min once a day for 21 consecutive days, respectively. Results showed that pulmonary damage occurred at 3-rd day of IHT, but one week later the pulmonary damage repaired in IHT animals with brief-time hypoxia (5 or 15 min), but 30-min and 60-min IHT groups showed pulmonary damage until 21-st day. Ultrastructurely, lungs in 5-min and 15-min IHT groups were characterized by hyperplasia of alveolar type II cells, which may enable them more rapid repairing of hypoxic lesions and may represent a key mechanism of the IHT. Those findings demonstrate that IHT could be justified as the impulse therapy for the cells and tissues.

Резюме

Интермиттирующие гипоксические тренировки (ИГТ) используют для профилактики и лечения различных заболеваний и для тренировки спортсменов. В нашем исследовании мы изучали морфологические изменения в легких при ИГТ с помощью световой и электронной микроскопии. 39 мужских особей крыс *Wistar* были подвергнуты интермиттирующим гипоксическим тренировкам (10 % O₂) по 5 мин 3 раза с 5-минутным интервалом либо по 15, 30, 60 мин 1 раз в день в течение 21 дня. Результаты показали, что на 3-й день ИГТ возникает повреждение легких, но при кратковременной гипоксии (5 или 15 мин) через неделю эти повреждения исчезают, а в группе с 30- или 60-минутной гипоксией повреждение легких сохраняется до 21-го дня. По данным ультраструктурного исследования, в легких у животных с 5- и 15-минутной ИГТ развивается гиперплазия альвеолоцитов 2-го типа, что может способствовать более быстрому устранению повреждений, возникающих в результате гипоксии, и это может представлять собой ключевой механизм эффекта ИГТ. Полученные данные показывают, что ИГТ можно использовать в качестве импульсной терапии.

Введение

Принцип интермиттирующих гипоксических тренировок (ИГТ) был предложен *С.Стрелковым и соавт.* в начале 1980-х гг. на основании их акушерской практики [1]. ИГТ показали значительный терапевтический эффект в профилактике и лечении различных заболеваний. В частности, заслуживает внимания факт, что этот метод дает очень хороший результат в тренировке спортсменов [2, 3]. Изучение ИГТ показало, что важной физиологической реакцией является увеличение гипоксического вентиляционного ответа (ГВО) [4].

Недавние исследования также продемонстрировали, что ИГТ подавляют продукцию свободных радикалов, оказывающих повреждающее воздействие на клетки и ткани, а также увеличивают скорость метаболических процессов в результате активации симпатической нервной системы [5, 6].

Хотя ИГТ используются для профилактики и лечения некоторых заболеваний, в настоящее время отсутствуют сведения о морфологических изменениях в легких под влиянием ИГТ. В данном исследовании авторы изучали вызванные ИГТ морфологические изменения в легких с помощью световой и электронной микроскопии.

Материалы и методы

/ Животные

Использованы 39 мужских особей крыс *Wistar* в возрасте 8 нед.: 3 особи были контрольными, остальные вошли в экспериментальную группу. Им был разрешен свободный доступ к пище и воде во время интермиттирующих гипоксических тренировок.

2. Интермиттирующие гипоксические тренировки

Гипоксия вызывалась воздействием 10%-ного кислорода в модели гипоксикатора (*Мурашов*). Крысы подвергались гипоксии 3 раза по 5 мин с 5-минутным интервалом либо по 15, 30, 60 мин 1 раз в день в течение 21 дня подряд. Контрольные крысы дышали обычным комнатным воздухом.

3. Световая и электронная микроскопия

На 3, 7, 21-й дни после интермиттирующей гипоксической тренировки (ИГТ) животные были анестезированы фенобарбиталом натрия (50 мг/кг), и легкие были удалены. Для исследования под световым микроскопом легкие были фиксированы в 10%-ном растворе формалина с 0,1 М раствором фосфатного буфера и залиты в парафин. Затем были приготовлены парафиновые срезы толщиной 2 мкм и окрашены гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования образцы легких крыс были нарезаны блоками по 2 мм³, фиксированы в 2,5%-ном растворе глутаральдегида и 0,1 М фосфатного буфера, постфиксированы в 1%-ном растворе четырехоксида осмия, дегидратированы в серии последовательных разведений спирта и залиты в Эпон 812. Полутонкие срезы были окрашены толуидиновым синим и использованы для световой микроскопии, а часть их — для приготовления тонких срезов. Тонкие срезы резали Ультратомом 5 000, окрашивали с использованием ацетата уранила и цитрата свинца. Срезы исследовались трансмиссионным электронным микроскопом *JEM-1010*.

Результаты

Результаты световой микроскопии

Гистологическое исследование в контрольной группе не выявляло изменений в легочной ткани в течение всего периода исследования. В группе, подвергавшейся гипоксии трижды по 5 мин с 5-минутным интервалом, на 3-й день появились значительный интерстициальный отек, утолщение межальвеолярных перегородок и дилатация капилляров, пролиферация интерстициальных клеток, коллапс альвеол и расширение альвеолярных ходов (рис. 1а). Такие же изменения выявлялись в группах, подвергавшихся ИГТ в

течение 15, 30 и 60 мин. Через 7 дней эти явления уменьшились (рис. 1б), но в группах, получавших 30 и 60-минутные ИГТ, по-прежнему сохранялись выраженные патологические изменения. Через 21 день у крыс, получавших ИГТ по 5 мин 3 раза с 5-минутным интервалом (рис. 1в и 2а) и 15-минутные ИГТ (рис. 2б), структура легких почти полностью восстановилась, но в группах, получавших ИГТ по 30 мин (рис. 2в) и 60 мин (рис. 2г), сохранялись значительные патологические изменения в легочной ткани.

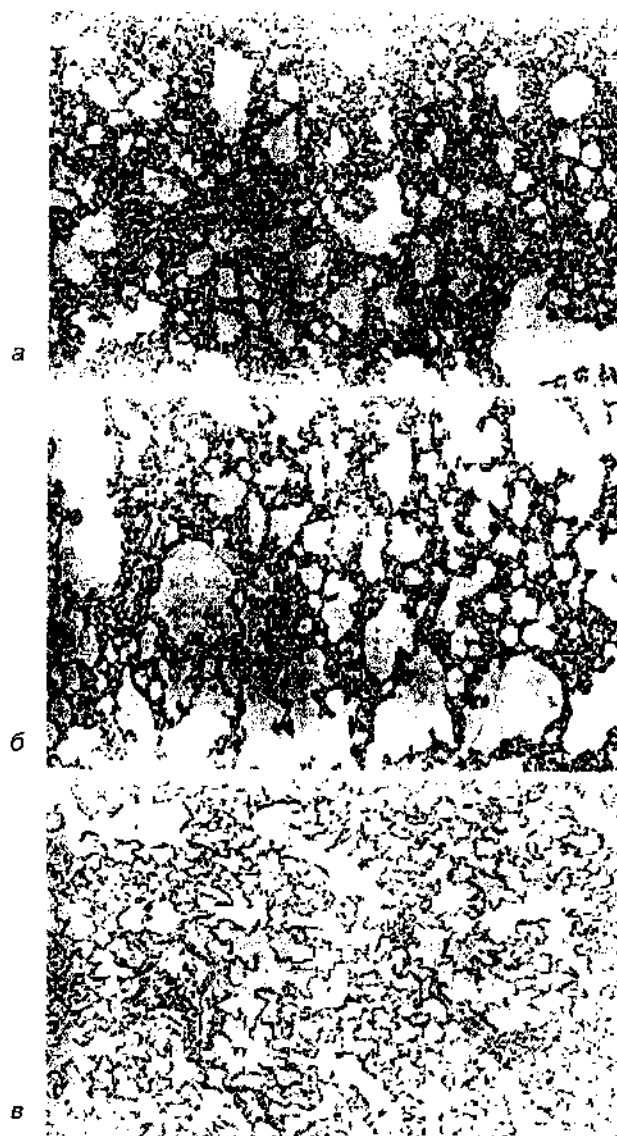


Рис. 1. Гистологические изменения в легких после трехкратной гипоксии по 5 мин с 5-минутным интервалом ($\times 100$):

а) 3-й день ИГТ. Значительный интерстициальный отек, утолщение межальвеолярных перегородок, выраженное расширение капилляров, пролиферация интерстициальных клеток, коллапс альвеол и расширение альвеолярных ходов;

б) 7-й день ИГТ: патологические изменения уменьшаются;

в) 21-й день ИГТ; структура легких восстановилась почти полностью

Результаты трансмиссионной электронной микроскопии

Электронная микроскопия обнаружила, что через 3 дня 5-минутных ИГТ трижды с 5-минутным интервалом в легких появились значительная дилатация капилляров, утолщение межальвеолярных перегородок и пролиферация клеток интерстиция (рис. 3а). В полостях альвеол обнаруживались дегенеративные осmioфильные пластинчатые тельца, вязкий белковый экссудат и эритроциты. Также выявлялись липидные зерна в альвеолярных перегородках. К 7-му дню наблюдались застойные явления в капиллярах, пролиферация альвеолоцитов 2-го типа и липидные зерна в альвеолярных перегородках. В 21-му дню отмечены застой в капиллярах, утолщение эндотелия капилляров, липидные зерна в альвеолярных перегородках и пролиферация альвеолоцитов 2-го типа (рис. 3б, и 4). Такие же ультраструктурные изменения легких наблюдались в группе, получавшей 15-минутные ИГТ.

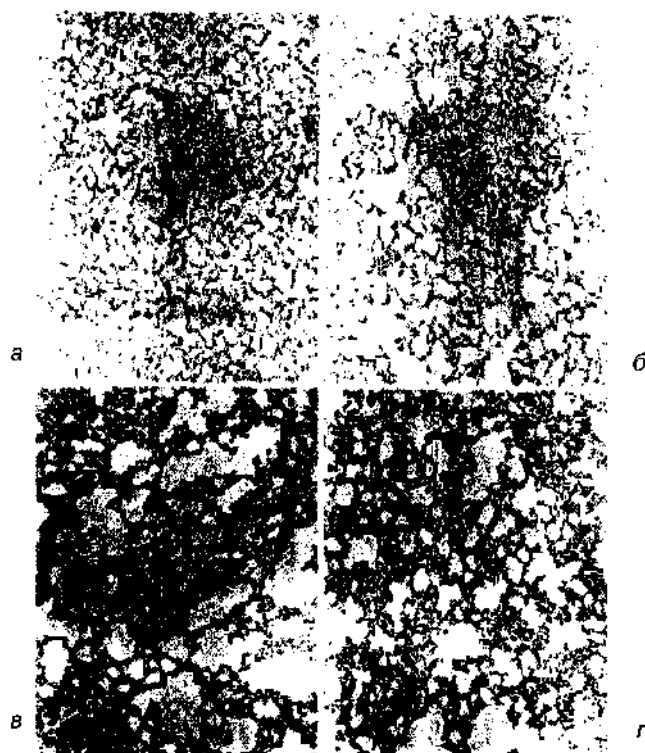


Рис. 2. Гистологические изменения в легких через 21 день ИГТ (х100):

- а) в группе, получавшей трехкратную ИГТ по 5 мин с 5-минутным интервалом, почти полностью восстановилась нормальная структура легких;
- б) в группе с 15-минутной ИГТ структура легких также почти нормальная;
- в) в группе с 30-минутной ИГТ сохраняются выраженные патологические изменения;
- г) в группе с 60-минутной ИГТ изменения те же, что и в группе с 30-минутной ИГТ

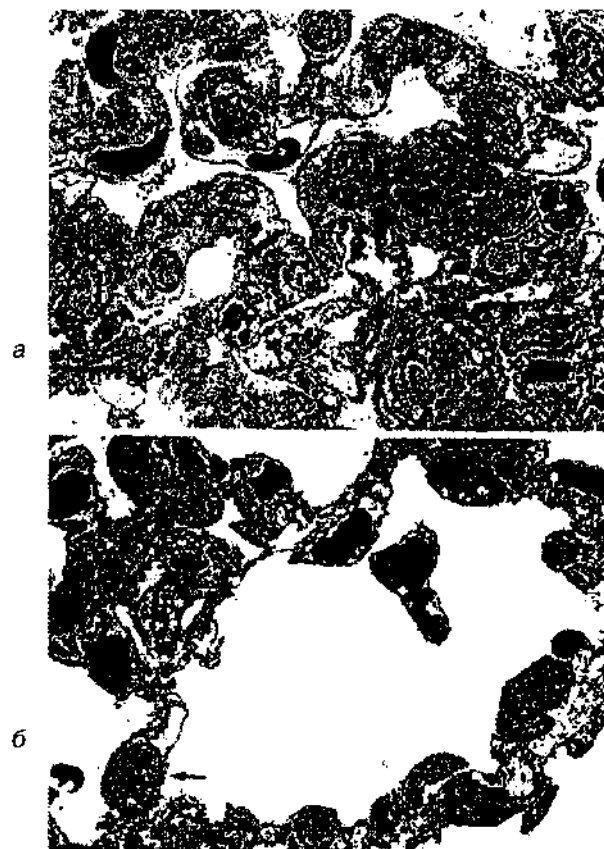


Рис. 3. Ультраструктурные повреждения легких после трехкратной ИГТ по 5 мин с 5-минутным интервалом:

- а) 3-й день ИГТ: значительная дилатация капилляров, утолщение межальвеолярных перегородок и пролиферация клеток интерстиция;
- б) 21-й день ИГТ: застой в капиллярах, утолщение эндотелия капилляров (стрелка на рисунке), липидные зерна в альвеолярных перегородках и пролиферация альвеолоцитов 2-го типа

Дискуссия

Интермиттирующие гипоксические тренировки (ИГТ) с повторными кратковременными ингаляциями гипоксических смесей были предложены *С.Стрелковыми соавт.* в начале 1980-х гг. на основании их акушерской практики. С 1983 г. авторы данной статьи используют ИГТ в клинике Окуяма в Токио и выявили хороший эффект ИГТ в лечении таких состояний, как бронхиальная астма, аллергические заболевания, сердечно-сосудистая патология, постменопаузальный синдром, нарушения сна и хронические воспалительные процессы. ИГТ также можно использовать для профилактики ряда заболеваний и тренировки спортсменов [1, 2]. Адаптация к интермиттирующей гипоксии может стимулировать гипоксический вентиляционный ответ (ГВО) у здоровых животных. Усиление ГВО является защитным механизмом против общей гипоксии организма. Короткие эпизоды гипоксии (часы, дни или месяцы) вызывают увеличение легочной вентиляции, в то

время как длительная гипоксия (декады) снижает вентиляционный ответ [3, 4]. У взрослых животных, в том числе и у человека, вентиляционный ответ на острую гипоксию двухфазный: после первоначального активного усиления вентиляция снижается через 15-30 мин до уровня плато, который обычно ниже нормоксического [7, 8]. Такой паттерн вентиляционного ответа очень похож на наблюдаемый у новорожденных, главное их различие заключается в уровне, до которого снижается вентиляция, и временных параметрах изменений. Традиционное объяснение двухфазности вентиляционного ответа на гипоксию состоит в том, что первоначальное быстрое увеличение вентиляции обусловлено активацией периферических хеморецепторов, а последующее ее снижение — дополнительным центральным депрессивным воздействием.

Механизм ИГТ остается неуточненным. Предполагается несколько механизмов, в том числе активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и угнетение свободно-радикальных процессов [5], увеличение секреции пептидергических нейронов паравентрикулярного гипоталамического ядра и активация вагуса [9], усиление нейротрансмиссии в каротидных тельцах, а также стимуляция центральных структур через активацию НАДФ-оксидазы [10], изменения метаболизма моноаминов [11], увеличение скорости метаболизма в результате активации симпатического звена нервной системы [6].

В нашем исследовании мы наблюдали морфологические изменения в легких после ИГТ при световой и электронной микроскопии. Мы обнаружили, что к 3-му дню гипоксии появляется повреждение легочной ткани, спустя неделю гипоксических воздействий у животных с кратковременной гипоксией (5 или 15 мин) эти повреждения восстанавливаются, но в группах с 30- и 60-минутной гипоксией повреждения сохраняются до 21-го дня. На ультраструктурном уровне у животных с 5- и 15-минутной гипоксией в легких развивается гиперплазия альвеолоцитов 2-го типа, что может способствовать более быстрому восстановлению поврежденных структур. Результаты показывают, что кратковременная гипоксия (5 или 15 мин) дает временное повреждение клеток на начальной стадии воздействия, которое быстро исчезает, что доказывает, что ИГТ вызывает значительный тканевой ответ, который может в конечном итоге приводить к восстановлению тканей.

Альвеолярный эпителий состоит из двух основных типов эпителиальных клеток. Большинство поверхности альвеол покрыто плоскими альвеолоцитами 1-го типа, которые очень легко повреждаются. Другой тип альвеолоцитов известен, в первую очередь, благодаря их способности синтезировать и секретировать легочный сурфактант. Эти клетки в то же время являются стволовыми клетками для альвеолярного эпителия благодаря пролиферации и превращению в клетки 2-го типа после повреждения последних, они также транспортируют ионы натрия из

альвеолярной жидкости в интерстиций для уменьшения объема жидкости внутри альвеол и за этот счет увеличения газообмена, а также, по-видимому, могут участвовать в воспалительном ответе [12].

Альвеолярные клетки 2-го типа синтезируют и секретуют сурфактант, который снижает альвеолярное поверхностное натяжение и стабилизирует альвеолы [13, 14]. Сурфактант подавляет адгезию нейтрофилов, хемотаксис и продукцию супероксида, которые, по-видимому, участвуют в повреждении легких при остром респираторном дистресс-синдроме [15]. Описан иммуномодулирующий эффект сурфактанта и его компонентов, хотя этот вопрос дискуссионен. *Wilsher et al.* описали, что сурфактант, выделенный у человека, морских свинок и кроликов, угнетает пролиферацию лимфоцитов периферической крови [16]. *Van Iwaarden et al.* установили, что специфический протеин сурфактанта (SP-A) усиливает фагоцитарную активность макрофагов [17].

В данном исследовании мы выявили выраженную гиперплазию альвеолоцитов 2-го типа после ИГТ. Пролиферация и дифференциация альвеолоцитов 2-го типа являются обычной реакцией альвеолярного эпителия на различные повреждающие факторы. Это фундаментальный механизм, лежащий в основе процесса восстановления альвеолярного эпителия и нормальной легочной функции после повреждения.



Рис. 4. Ультраструктурные изменения в легких на 21-й день трехкратной ИГТ по 5 мин с 5-минутным интервалом: пролиферация альвеолоцитов 2-го типа

К гиперплазия альвеолоцитов 2-го типа, которую мы наблюдали, может представлять собой ключевой механизм действия ИГТ.

1

Выводы

1. Терапия ИГТ вызывает временное повреждение клеток на начальной стадии, а затем происходит восстановление структуры, что объясняет выраженный тканевой ответ на ИГТ-терапию, приводящий к выздоровлению.
2. Терапевтический эффект ИГТ доказан в нашем исследовании.
3. Терапия ИГТ может объяснить механизм импульсной терапии на клеточном и тканевом уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Strelkov R.B.* On the possible clinical use of a gas hypoxic mixture of the radioprotectant? In: Annual meeting of the European society for radiation biology: Book of abstracts. Rome; 1972. 406.
2. *Serebrovskaya T., Swanson R., Karaban I.N. et al.* Intermittent hypoxia alters hypoxic ventilatory responses. *Fiziol. Zh.* 1999; 45 (5): 9-18.
3. *Serebrovskaya T., Swanson R., Mankovskaya I. et al.* Training with intermittent hypoxia influence free radical processes and glutathione antioxidant system enzymes in bronchial asthma patients. *Allerg. Immunol.* 1995; 27: 266.
4. *Howard L.S., Robbins P.A.* Alterations in respiratory control during 8 h of isocapnic and poikilocapnic hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol.* 1995; 78 (3): 1098-1107.
5. *Adiatulin A.L., Piliavskaya A.N., Takchuk E.N., Guliaeva N.V.* Various mechanisms of protective action of interval hypoxic training during preparation for abdominal delivery. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 1997; 3: 26-29.
6. *Cao K.Y., Zwillhach C.W., Berthon-Jones M., Sullivan C.E.* Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 1992; 73 (5): 2083-2088.
7. *Vizek M., Picklett C.K., Weil J.V.* Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin. *J. Appl. Physiol.* 1987; 63 (4): 1658-1664.
8. *Borel CO., Guy J., Barcik U. et al.* Effect of hypobaria on ventilatory and CO₂ responses to short-term hypoxic exposure in cats. *Respir. Physiol.* 1998; 101 (1): 45-53.
9. *Abramov A.V.* Effect of the intermittent hypoxic training on the functioning of peptidergic neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus and brain stem neurons in rats. *Russ. Fiziol. Zh. im I. M. Sechenova* 1998; 84 (3): 173-181.
10. *Olano M., Song D., Murphy S. et al.* Relationships of dopamine, cortical oxygen pressure, and hydroxyl radicals in brain of newborn piglets during hypoxia and posthypoxic recovery. *J. Neurochem.* 1995; 65 (3): 1205-1212.
11. *Solo-Aeape I., Burton M.D., Kazemi H.* Central amino acid neurotransmitters and the hypoxic ventilatory response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151 (4): 1113-1120.
12. *Mason R.J.* Role of alveolar type II epithelial cells in interstitial lung disease. *J. Jpn. Med. Soc. Bio. Interface* 1988; 19: 1-9.
13. *Goerke J.* Lung surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* 1974; 344: 244-305.
14. *Suwabe A., Takahashi K., Saito Y. et al.* Surfactant secretion from alveolar type II cells. *Jpn. Med. Soc. Bio. Interface* 1995; 26: 37-47.
15. *Otake K., Suwabe A., Yakuwa N. et al.* Effects of artificial surfactant (surfacten) on human neutrophilic functions. *J. Jpn. Med. Soc. Bio. Interface* 1993; 24: 84-92.
16. *Wilsher M.L.* Immunoregulatory properties of pulmonary surfactant: effect of lung lining fluid on proliferation of human blood lymphocytes. *Thorax* 1988; 43: 354-359.
17. *Van Iwaarden E.B., Wehners J., Verhoef H.P. et al.* Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1990; 2: 9118.