

## Р. В. Янко

### ГІСТО-МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТКАНИНИ ЛЕГЕНЬ ДОРΟΣЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ РІЗНИХ ВИДІВ АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

#### ГІСТО-МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТКАНИНИ ЛЕГЕНЬ ДОРΟΣЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ РІЗНИХ ВИДІВ АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ

Р. В. Янко

Резюме

*Мета дослідження* – дослідити та порівняти гісто-морфологічні зміни тканини легень дорослих щурів після впливу різних видів аліментарної депривації (АД).

*Матеріали та методи.* Дослідження проведене на 36 щурах-самцях лінії Вістар у віці 15 місяців. Одна група дослідних щурів була під впливом інтервальної (1 доба повне голодування / 2 доби стандартний раціон харчування), а інша – часткової (знижений раціон за калорійністю на 30 % порівняно з контролем) АД. Загальна тривалість експерименту становила 28 днів. Доступ до води був вільний. Гістологічні препарати легень виготовляли за стандартною методикою. Гісто-морфометрію цифрових зображень препаратів проводили за допомогою комп'ютерної програми «Image J».

*Результати.* Після закінчення експерименту у легенях щурів, які зазнавали впливу часткової АД, відзначали збільшення відносної площі повітряних просторів, зростання розмірів просвіту альвеол, їх глибини та ширини входу в них, зменшення площі паренхіми і строми і кількості сполучнотканинних елементів. Дані гісто-морфометричні показники у легенях тварин після впливу інтервальної АД залишалися близькими до контрольних значень. Зниження товщини міжальвеолярної перетинки може свідчити про покращення альвеолярно-капілярного газообміну.

*Висновки.* Виразність змін у легенях тварин після впливу часткової АД проявлялася в значно більшій мірі, ніж після дії інтервального голодування. Зміни основних гісто-морфометричних показників тканини легень, після дії АД, вказують на наявність ознак підвищення повітряноповноти легень та покращення процесів газообміну.

**Ключові слова:** аліментарна депривація, респіраторний відділ легень.

Укр. пульмонолог. журнал. 2023;31(1):72–75.

Янко Роман Васильович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ

Старший науковий співробітник відділу

клінічної фізіології сполучної тканини, канд. біол. наук

4, вул. Богомольця, м. Київ, 01024

Тел. +38 044 256-24-77, biolag@ukr.net

#### HISTOMORPHOLOGICAL CHANGES OF LUNG TISSUE OF ADULT RATS AFTER EXPOSURE TO DIFFERENT TYPES OF ALIMENTARY DEPRIVATION

R. V. Yanko

Abstract

*The aim of the study* was to investigate and compare histomorphological changes in the lung tissue of adult rats after exposure to various types of alimentary deprivation (AD).

*Materials and methods.* The study was conducted on 36 rats of Wistar lines at the age of 15 months. One group of experimental rats was under the influence of interval (1 day full fasting / 2 days standard diet) and the other – partial (reduced calorie diet by 30 % compared to control) AD. The total duration of the experiment was 28 days. Water access was free. Histological lung preparations were made according to the standard technique. Histo-morphometry of digital images was performed using the computer program “Image J”.

*Results.* At the end of the experiment, exposed to partial AD rats demonstrated an increase in the relative area of the air spaces, the increase in the size of the lumen of the alveoli, their depth and width of the entrance to them, the decrease in the area of the parenchyma and stroma and the number of connective tissue elements. The data of histomorphometric parameters of the lungs of animals after exposure to the interval AD remained close to the control values. Reducing the thickness of the interalveolar septum may indicate the improvement of alveolar-capillary gas exchange.

*Conclusions.* The severity of changes in the lungs of animals after the exposure of a partial AD was manifested to a much greater extent than after interval fasting. Changes in the main histomorphometric indicators of lung tissue, after the action of the AD, indicate the presence of signs of increased pulmonary airiness and improvement of gas exchange processes.

**Key words:** alimentary deprivation, lung respiratory part.

Ukr. Pulmonol. J. 2023;31(1):72–75.

Roman V. Yanko

Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine

Senior research assistant, PhD

4, Bogomolets Str., Kyiv 01024, Ukraine.

Tel. +38 044 256-24-77, biolag@ukr.net

Позитивну дію аліментарної депривації (АД) на організм доведено численними науковими роботами. Так, відомо, що вона покращує метаболічний стан організму, зменшуючи запалення та окислювальний стрес [3]. Терапія голодування може сприяти лікуванню та профілактиці хронічних захворювань, включаючи серцево-судинні, ендокринні розлади, новоутворення, діабет, неврологічні порушення тощо [11, 14]. Корисний ефект АД є результатом активації адаптивних клітинних сигнальних шляхів реакції на стрес, які поліпшують відновлення ДНК, стан мітохондрій тощо. АД здатна викликати аутофагію, яка стимулює новий ріст здорових клітин і підвищує здатність організму протистояти внутрішнім

стресам [10]. Можна припустити, що найближчим часом АД буде відмічена в рекомендаціях лікарів як додатковий метод лікування [4].

Але, незважаючи на добре вивчений ефект АД на організм, літературних даних щодо її впливу на морфо-функціональну активність легень (особливо на їх гісто-морфологічну структуру) недостатньо, а отримані результати часто мають суперечливий характер. Це може бути пов'язано з різним типом голодування, тривалості проведення експериментів, віку та статі тварин тощо. Все це підкреслює актуальність проведення досліджень у даному напрямку. В науковій літературі опубліковано факти щодо лікувального ефекту АД при деяких захворюваннях легень. Так виявлено, що низькокалорійна дієта запобігає виникненню симптомів астми, знижує розвиток появи канцерогенезу та зменшує ряд вікових захворювань легень [5, 7, 8].

© Янко Р.В., 2022

www.search.crossref.org

DOI: 10.31215/2306-4927-2023-31-1-72-75

Метою роботи було дослідити та порівняти гістоморфологічні зміни тканини легень дорослих щурів після впливу різних видів АД.

**Матеріали та методи**

Дослідження проведене на 36 щурах-самцях лінії Вістар у віці 15 місяців. Щурів розділили на 3 групи: I — контроль; II — щури, яких піддавали впливу інтервальному голодуванню, а саме — 1 доба повне голодування / 2 доби стандартний віварний раціон; III — тварини, які отримували віварний корм знижений по масі на 30 % порівняно з контролем (часткова АД). Контрольний щур щодня отримував 20 г сбалансованого корму (65 ккал), а щур з III групи — 14 г (45 ккал). Таку ступінь зниження калорійності харчування, відповідно до класифікації МасКея С.М., відносять до «м'якої» АД, яка здатна подовжувати тривалість життя, підвищувати ефективність функціонування молекулярних та клітинних систем, збільшувати адаптивні можливості організму. Доступ до води був вільним. Тривалість експерименту становила 28 діб. Щурів виводили під ефірною анестезією. Дослідження проводили відповідно до положень «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Strasbourg, 1985).

В кінці експерименту вимірювали масу тіла, легень та визначали легеневий індекс (відношення маси легень до маси тіла). З тканини легень виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою: фіксували в рідині Буена, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та діоксані, заливали в парафін. Парафінові зрізи (товщиною 5–6 мкм) були виготовлені на санному мікротомі. Забарвлювали зрізи гематоксиліном Бемера та еозином, а для візуалізації елементів сполучної тканини — методом Ван Гізона [1]. З мікропрепаратів робили фотознімки на мікроскопі «Nikon Eclipse E100» (Японія), який оснащений цифровою камерою. Гістоморфометрію проводили за допомогою комп'ютерної програми «Image J».

На гістологічних зрізах легеневої тканини вимірювали: середній діаметр та площу просвіту альвеол, їх глибину, ширину входу в альвеолу, товщину міжальвеолярної перетинки, діаметр просвіту респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів та мішечків. За допомогою накладення морфометричних сіток вимірювали відносну площу паренхіми і строми, повітряного простору та визначили їх співвідношення [2, 13]. Морфометричні виміри проводили на зрізах, де чітко видно альвеолярні ходи та альвеоли.

Статистичний аналіз здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 6.0». Для оцінки вірогідності різниці між контрольною та дослідними групами використовували t-критерій Ст'юдента. Відмінності вважали вірогідними при  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення**

Виявлено, що маса тіла щурів, які зазнавали інтервальної та часткової АД, була вірогідно меншою від контролю на 9 і 13 % відповідно. Маса легень у дослідних щурів також була меншою від контрольних показників на 5 (II група) і 17 % (III група;  $p < 0,05$ ). При цьому легеневий індекс не відрізнявся від контрольних значень (табл. 1).

Таблиця 1

Маса тіла та легень ( $M \pm m, n=12$ )

Показники	Контроль	Інтервальна аліментарна депривація	30 % аліментарна депривація
Маса тіла, г	425 ± 7	385 ± 13*	369 ± 10*
Маса легень, г	4,06 ± 0,45	3,86 ± 0,30	3,35 ± 0,66*
Легеневий індекс	0,0096 ± 0,0003	0,0100 ± 0,0002	0,0091 ± 0,0003

Примітка. \* — вірогідні відмінності порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).

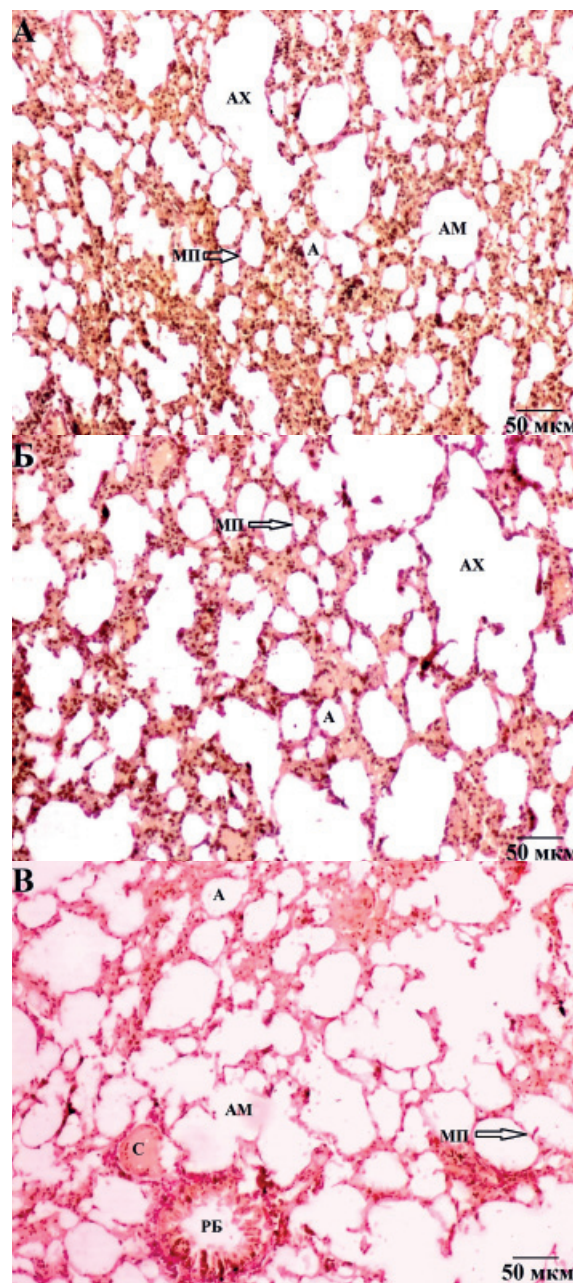


Рис. Мікрофотографія респіраторного відділу легень контрольної тварини (А) та щурів, які зазнавали впливу інтервальної (Б) та часткової (В) аліментарної депривації. Забарвлення за Ван Гізонам.  $\times 200$ . Примітки: А – альвеола, АХ – альвеолярний хід, АМ – альвеолярні мішечки; РБ – респіраторна бронхіола, МП – міжальвеолярна перетинка, С – кровоносна судина

Респіраторний відділ легень (РВЛ) представлений респіраторними бронхіолами (РБ), альвеолярними ходами (АХ), альвеолярними мішечками (АМ) та альвеолами. Більшість альвеол перебувала у нормальному стані, менша частина — у стані фізіологічного ателектазу, чи помірному розширенні. Просвіт РБ, АХ та АМ вільний. Десквамації альвеолярного епітелію не відмічено (рис.).

Гісто-морфометричні зміни показників РВЛ, після впливу АД різних видів, мали однонаправлений характер. Проте, виразність змін у легенях тварин після впливу часткової АД проявлялася в значно більшій мірі, ніж після інтервального голодування. Так, у щурів III групи виявили більші розміри альвеол (діаметр — на 14 % ( $p < 0,05$ ), площа — на 10 %), ніж у контрольних тварин. У цій групі тварин спостерігали чітку тенденцію до зростання глибини альвеол та ширини їх входу на 9 і 7 % відповідно. Хоча загальна площа альвеолярної поверхні, після знаходження щурів на 30 % АД, збільшувалася, але вона ніколи не виходила за межі норми і не досягала розмірів, характерних для емфізематозного стану. Також у цих щурів виявили вірогідно меншу відносну площу паренхіми і строми на 14 % та більшу площу повітряних просторів на 13 % порівняно з контролем. Це призвело до вірогідно меншого відношення площі паренхіми і строми до площі повітряних просторів на 29 %. Це може свідчити про підвищення повітрянаповненості легень та покращення процесів газообміну. Тоді як у щурів, які зазнавали впливу інтервальної АД, більшість гісто-морфометричних показників РВЛ не мали суттєвих відмінностей порівняно з контрольними значеннями (табл. 2).

Товщина міжальвеолярної перетинки у щурів, після впливу АД, вірогідно зменшилася на 33 % порівняно з контролем (табл. 2). Як відомо, міжальвеолярна перетинка складається з епітеліальних шарів альвеол, підепітеліальних базальних мембран, мережі кровоносних капілярів, а також еластичних, ретикулярних і колагенових волокон — її найбільш вираженого структурного компоненту. Очевидно, що зменшення товщини міжальвеолярної перетинки, в першу чергу, може бути пов'язане зі зменшенням вмісту в ній сполучнотканинних елементів.

Такі зміни призводять до покращення альвеолярно-капілярного газообміну [9].

Сполучна тканина формує не тільки основу легень, а й трахео-бронхіального дерева, розподіляючись по всій його протяжності — від трахеї до респіраторних відділів. Відділи сполучнотканинної основи легень відрізняються за клітинним складом і будовою екстрацелюлярного матриксу. При фарбуванні препаратів за методом Ван-Гізона виявлено зниження кількості пучків колагенових волокон у РВЛ щурів (особливо після впливу 30 % АД). Найбільша кількість сполучнотканинних елементів була розміщена навколо РБ, кровоносних судин, меншою мірою — у міжальвеолярних перетинках.

Літературні дані, щодо впливу АД на стан легень, мають неоднозначний характер. Це, скоріш за все, пов'язано з різними режимами її впливу. Так, є літературні дані, які свідчать про розвиток емфіземи легень після впливу жорсткої АД. Виявлено, що після 2 або 3 тижнів обмеження калорій до 1/3 від їх норми, легені стали жорсткішими та менш еластичними. Крім того, зменшилася ємність легень. Ці механічні зміни в легенях зникли через 2 тижні, після отримання мишами стандартного харчування *ad libitum* [6]. В експерименті проведеному на мишах дослідники виявили, що низькокалорійна дієта запобігає виникненню симптомів астми, незалежно від вмісту жирів і цукру в раціоні [8]. При дослідженні впливу різних режимів АД, а саме: обмеження раціону на 40 % чи інтервальна АД (1 доба повного голодування на тиждень, протягом місяця) виявлено зниження канцерогенезу у легенях мишей, через зменшення активності гена p53 [5].

Показано, що довготривалий вплив АД сприяє зниженню ризику виникнення ряду захворювань легень, які тісно пов'язані зі старістю. Так, виявлено, що вплив АД індукує збільшення базальних стовбурових клітин у легенях, збільшує кількість і функцію мітохондрій альвеолоцитів, значно знижує (викликане старінням) запалення легень у старих мишей [7]. Інші автори виявили, що вплив 33 % АД протягом 2 тижнів зменшує кількість альвеол на 55 %, без зміни об'єму легень. Протягом

Таблиця 2

Морфометричні показники стану респіраторного відділу легень ( $M \pm m$ ,  $n = 12$ )

Показники	Контроль	Інтервальна аліментарна депривація	30 % аліментарна депривація
Середній діаметр просвіту альвеоли, мкм	22,4 ± 0,48	24,4 ± 1,07	25,6 ± 0,57*
Площа поперечного перерізу альвеоли, мкм <sup>2</sup>	599 ± 25	630 ± 34	661 ± 21
Глибина альвеоли, мкм	19,7 ± 0,9	21,0 ± 0,7	21,5 ± 0,5
Ширина входу в альвеолу, мкм	12,3 ± 0,4	12,0 ± 0,4	13,2 ± 0,4
Ширина просвіту РБ, АХ та АМ, мкм	67,8 ± 2,1	65,2 ± 2,3	64,7 ± 3,0
Товщина міжальвеолярної перетинки, мкм	4,3 ± 0,1	2,9 ± 0,2*	2,9 ± 0,2*
Відношення ширини входу в альвеолу до її глибини	0,62 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,61 ± 0,03
Відношення діаметру РБ, АХ та АМ до подвійної глибини альвеоли	1,72 ± 0,10	1,55 ± 0,07	1,50 ± 0,07*
Відносна площа паренхіми і строми, %	41,1 ± 2,7	40,8 ± 2,7	35,5 ± 2,6*
Відносна площа повітряних просторів, %	58,9 ± 2,7	59,2 ± 3,5	66,5 ± 3,6*
Відношення площі паренхіми і строми/площі повітряних просторів	0,70 ± 0,08	0,69 ± 0,11	0,50 ± 0,11*

Примітка: \* — вірогідні відмінності порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); РБ – респіраторні бронхіоли, АХ – альвеолярні ходи, АМ – альвеолярні мішечки.

цього часу у дослідних мишей зросла кількість апоптичних клітин, а вміст ДНК в легенях знизився на 20 %. При цьому, некрозів виявлено не було. Після відновлення харчування морфологічні зміни в легенях, викликані АД, зникали [12].

### Висновки

1. Виявлено, що щури, які протягом 28 днів перебували під впливом аліментарної депривації різних видів, мали однотипні за характером гісто-морфологічні зміни тканини легень. Проте, виразність змін у легенях тварин після впливу обмеженого харчування на 30 % проявлялася в значно більшій мірі, ніж після інтервальної алі-

ментарної депривації (1 доба повне голодування / 2 доби стандартний раціон).

2. Зміни основних гісто-морфометричних показників тканини легень, після дії аліментарної депривації, вказують на наявність ознак підвищення повітряності легень. Про це свідчать збільшення відносної площі повітряних просторів, зростання розмірів просвіту альвеол, їх глибини та ширини входу в них, зменшення площі паренхіми і строми та кількості сполучнотканинних елементів.

3. Показано, що у щурів, після впливу аліментарної депривації різних видів, зменшується товщина міжальвеолярної перетинки, що може сприяти прискоренню дифузії кисню через альвеоло-капілярні мембрани.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Вахнюк ТВ. Гістологія з технікою гістологічних досліджень. Київ: Медицина. 2018;256 с.
2. Вейбель ЭР. Морфометрия легких человека. Москва: Медицина. 1970;174 с.
3. Aksungar FB, Topkaya AE, Akyildiz M. Interleukin-6, C-reactive protein and biochemical parameters during prolonged intermittent fasting. *Ann Nutr Metab.* 2007;51:88–95. doi: 10.1159/000100954.
4. Armutcu F. Fasting may be an alternative treatment method recommended by physicians. *Electron J Gen Med.* 2019;16(3):em138. doi: 10.29333/ejgm/104620.
5. Berrigan D, Perkins SN, Haines DC, et al. Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):817–822. doi: 10.1093/carcin/23.5.817.
6. Bishai JM, Mitzner W. Effect of severe calorie restriction on the lung in two strains of mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(2):L356–L362. doi: 10.1152/ajplung.00514.2007.
7. Hegab AE, Ozaki M, Meligy FY, et al. Calorie restriction enhances adult mouse lung stem cells function and reverses several ageing-induced changes. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(2):295–308. doi: 10.1002/term.2792.
8. Hopkins J. Medicine. "Calorie restriction prevents asthma symptoms linked to inflammation in mice." *ScienceDaily*, 30 January 2019. Available at: [www.sciencedaily.com/releases/2019/01/190130133059.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2019/01/190130133059.htm).
9. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem. Cell. Biol.* 2018;150(6):661–676. doi: 10.1007/s00418-018-1747-9.
10. Liu H, Javaheri A, Godar RJ, et al. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy.* 2017;13:1952–1968. doi: 10.1080/15548627.2017.
11. Michalsen A, Li C. Fasting therapy for treating and preventing disease - current state of evidence. *Forsch Komplementmed.* 2013;20:444–453. doi: 10.1159/000357765.
12. Polak JM. Cell therapy for lung disease. London: Imperial College Press. 2010;1649 p.
13. Yanko R, Chaka E, Levashov M. Effect of methionine on the lungs respiratory part in rats of different ages. *Pol. J. Natural. Sc.* 2021;36(4):447–456.
14. Yanko RV, Levashov MI. Effect of interval fasting on morphological changes in the rat thyroid gland of different age. *Biological sciences of Kazakhstan.* 2021;1:8–18. doi: 10.52301/1684-940X-2021-1-8-18.

### REFERENCES

1. Vakhnyuk TV. *Gistologiya z tekhnikoyu gistologichnykh doslidzhen* (Histology with histological research technique). Kyiv: Medytsyna. 2018;256p.
2. Weibel ER. *Morfometriya legkikh cheloveka* (Morphometry of the human lungs): Moscow: Meditsina. 1970;174p.
3. Aksungar FB, Topkaya AE, Akyildiz M. Interleukin-6, C-reactive protein and biochemical parameters during prolonged intermittent fasting. *Ann Nutr Metab.* 2007;51:88–95. doi: 10.1159/000100954.
4. Armutcu F. Fasting may be an alternative treatment method recommended by physicians. *Electron J Gen Med.* 2019;16(3):em138. doi: 10.29333/ejgm/104620.
5. Berrigan D, Perkins SN, Haines DC, et al. Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):817–822. doi: 10.1093/carcin/23.5.817.
6. Bishai JM, Mitzner W. Effect of severe calorie restriction on the lung in two strains of mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(2):L356–L362. doi: 10.1152/ajplung.00514.2007.
7. Hegab AE, Ozaki M, Meligy FY, et al. Calorie restriction enhances adult mouse lung stem cells function and reverses several ageing-induced changes. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(2):295–308. doi: 10.1002/term.2792.
8. Hopkins J. Medicine. "Calorie restriction prevents asthma symptoms linked to inflammation in mice." *ScienceDaily*, 30 January 2019. Available at: [www.sciencedaily.com/releases/2019/01/190130133059.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2019/01/190130133059.htm).
9. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem. Cell. Biol.* 2018;150(6):661–676. doi: 10.1007/s00418-018-1747-9.
10. Liu H, Javaheri A, Godar RJ, et al. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy.* 2017;13:1952–1968. doi: 10.1080/15548627.2017.
11. Michalsen A, Li C. Fasting therapy for treating and preventing disease - current state of evidence. *Forsch Komplementmed.* 2013;20:444–453. doi: 10.1159/000357765.
12. Polak JM. Cell therapy for lung disease. London: Imperial College Press. 2010;1649 p.
13. Yanko R, Chaka E, Levashov M. Effect of methionine on the lungs respiratory part in rats of different ages. *Pol. J. Natural. Sc.* 2021;36(4):447–456.
14. Yanko RV, Levashov MI. Effect of interval fasting on morphological changes in the rat thyroid gland of different age. *Biological sciences of Kazakhstan.* 2021;1:8–18. doi: 10.52301/1684-940X-2021-1-8-18.