

615.835.5[546.21]-092.9

NĚKTERÉ PATOLOGICKÉ NÁLEZY U EXPERIMENTÁLNÍCH ZVÍŘAT PŘI DLOUHODOBÉ INHALACI KYSLÍKU

MUDr. Vladimír DOLEŽAL a František NÁDVORNÍK, prom. lékař
Ústav leteckého zdravotnictví, Praha, Ústav pro soudní lékařství FVL-KU
v Praze

Aplikace kyslíku je jedním z nejstarších a nejrozšířenějších způsobů terapie hypoxických stavů. Používá se ho v různých odvětvích medicíny a kromě toho běžně k prevenci výškové hypoxie v letectví. Přes toto rozsáhlé terapeutické a preventivní použití kyslíku inhalační cestou není stále dostatečně prozkoumán jeho škodlivý účinek.

Kyslík může působit toxicky, jak předpokládal již v roce 1781 Priestly a popsal v roce 1789 Lavoisier. Pozdější obšírné práce Paul Berta (1878) nás nenechávají na pochybách, že patologické změny, které pozoroval při inhalaci vzduchu při zvýšeném barometrickém tlaku, jsou způsobeny kyslíkem a nikoli zvýšeným barometrickým tlakem. Bert věnoval hlavní pozornost změnám centrálního nervového systému. Ostatním orgánovým změnám nepřikládal při hyperoxii velkou důležitost. Patologické nálezy při hyperoxii v plicích pozoroval v roce 1899 Smith, později v roce 1912 si všímali změn u opic Bornstein a Stroing a u morčat a králíků Schmidt a David. Teprve Karsner v četných pokusech prokázal v roce 1916, že toxický účín kyslíku, působícího při normálním barometrickém tlaku, spočívá hlavně na vyvolaných plicních změnách. Později se této otázce věnovalo více autorů (15, 34, 35, 31, 23, 38, 10, 11, 3, 14, 28, 37, 20, 29, 30, 2, 26, 22, 19).

Byla zkoumána hlavně doba přežití pokusných živočichů v kyslíkové atmosféře, nejvyšší snesitelná koncentrace hlavně pro účely letecké medicíny a zjišťovány patologicko-anatomické nálezy u živočichů uhynulých v kyslíku.

V posledních letech se vyskytlo více prací (17, 12, 33, 1, 18, 21) pojednávajících o histopatologických změnách na plicích zvířat uhynulých v kyslíkové atmosféře, též při použití elektronového mikroskopu, kde byly zjišťovány mimo jiné hyalinní membrány v alveolech a respiračních bronchiolech a vakuolizace mitochondrií buněk alveolární stěny.

V této práci jsme podali rozbor makroskopických a mikroskopických patologických nálezů u zvířat, jak se jevíly v průběhu inhalace kyslíku, a pokusili jsme se o zjištění doby, po které se objevují změny v plicích pokusných zvířat.

Dále jsme zjišťovali, zda sekundární infekce kyslíkem tangovaných plic má vliv na přežití pokusných živočichů v kyslíkové atmosféře, jak se udává v literatuře (29, 30, 26).

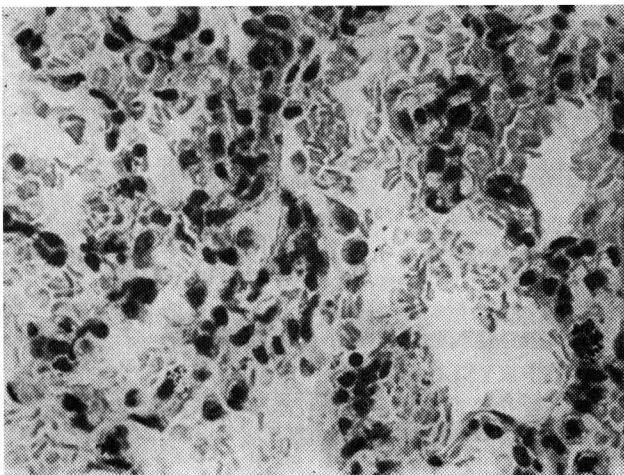
Metoda

Pokusy byly provedeny v komoře o objemu 0,8 m³, která byla ventilována kyslíkem. CO₂ byl absorbován jednak na nátronové vápno, jednak se odstraňoval zvýšenou ventilací komory kyslíkem. Teplota a vlhkost byly odstraňovány zvýšenou ventilací komory kyslíkem. Bylo použito 110 morčat (samečků) ve dvou pokusech, o váze 290 ± 25 g. Před každým pokusem byla morčata označena čísly a pak postupně utrácena dekapitací po skupinách podle náhodně zvolených čísel.

V prvním pokuse byla morčata utrácena po 17, 24, 30, 48, 58, 66, 72, 85 a 98 hodinách působení kyslíku. U každého morčete byl proveden morfologický rozbor orgánů a stanoven váhový index plic podle Johnsona a Beana:

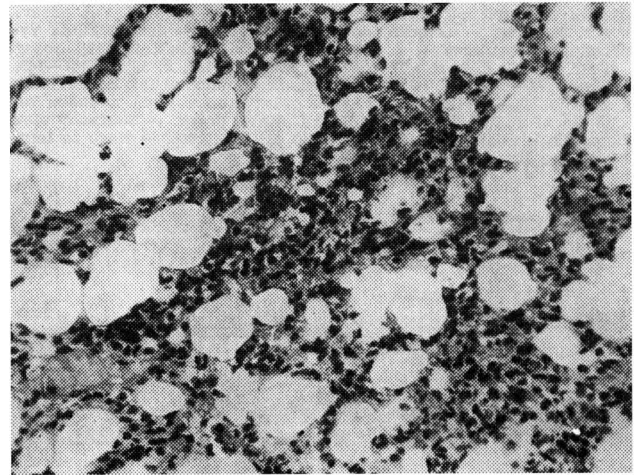
$$I = \frac{\text{váha plic} \times 100}{\text{celková váha zvířete}}$$

V druhém pokusu byla morčata rozdělena do 3 skupin po 18 kusech náhodným výběrem. Prvé skupině byla aplikována antibiotika, druhé fyziologický roztok a třetí skupině byly provedeny jen injekční vpichy. Před pokusem byl proveden bakteriologický rozbor flóry z horních dýchacích cest a stanovena citlivost na antibiotika u zjištěných kmenů. U uhynulých morčat byl prováděn morfologický a bakteriologický rozbor plicní tkáně. Každé morče z první skupiny obdrželo tato antibiotika: 5000 jdn. penicilínu, 5 mg streptomycinu a 10 mg chloramfenikolu. Tato množství antibiotik dostávalo každé morče po celou dobu pokusu 2× denně. Před vlastním pokusem byla provedena zkouška citlivosti vůči používaným antibiotikům na skupině 10 morčat. Pokusná zvířata dostávala po dobu 5 dnů uvedená antibiotika v dvojnásobné dávce. Přitom byly



Obr. 1

Po 48 hodinách pobytu v kyslíkové atmosféře: výrazné překrvení kapilár interalveolárních sept s erythrodiapedézou do alveolů (HE, 240×)



Obr. 2

Po 48 hodinách pobytu v kyslíkové atmosféře: zánětlivá celulóza interalveolárních sept, podmiňující jejich rozšíření (HE, 120×)

zjišťovány rozdíly v chování, příjmu potravy apod. proti morčatům kontrolním.

Rozdíly v době přežití pokusných zvířat mezi skupinou, která dostávala antibiotika, a mezi kontrolními skupinami během pokusu v kyslíkové atmosféře byly počítány statisticky pomocí Wicoxonova testu.

Významnost rozdílů průměrů váhy plic morčat utrácených po určité době inhalace kyslíku byla hodnocena statisticky metodou analýzy rozptylu jednoduchého třídění. Pro bližší stanovení rozdílů průměrů mezi jednotlivými skupinami morčat bylo použito zobecněné Duncanovy metody.

Na histologické vyšetření byly excize z orgánů uhynulých zvířat fixovány 10% formolem a pak běžnou technikou připraveny parafínové řezy. Řezy byly barveny hematoxylin-eozinem, metodou van Giesonovou, Massonovým trichromem, Malloryho hematoxylinem, Gramovou metodou, Weigertovou metodou na průkaz fibrinu.

Výsledky

Při statistickém stanovení významnosti rozdílů průměrů váhy plic morčat utrácených po určité době pobytu v kyslíkové atmosféře byla získána tato tabulka analýzy rozptylu:

$S_T = 7,84$	7	1,12
$S_e = 1,59$	47	0,03382
$S_c = 9,43$	54	0,01746

$$F = \frac{0,034}{1,12} = 33,11 > F_{1\%} = 1,93$$

Bylo zjištěno, že inhalace kyslíku vysoce významně ovlivňuje váhu plic živočichů ($p < 0,01$). Při bližším stanovení váhových rozdílů pomocí zobecněné Duncanovy metody (s hladinou významnosti 95 %) bylo zjištěno, že váha plic stoupá významně již po 30 hodinách inhalace kyslíku.

V níže uvedené tabulce se hodnoty podtržené stejnou čarou od sebe významně neliší:

17	24	30	58	66	72	85	98	hodiny pobytu v kyslík. atm.
0,718	0,741	0,818	0,826	1,196	1,202	1,379	1,520	váhový index plic

Z tabulky je patrné, že se nenalezl statisticky významný rozdíl v šetření 17—30 hodin a šetření 66—98 hodin. Metoda stanovila významný rozdíl mezi každým šetřením 1. skupiny a skupinou šetření 66—98 hodin (viz graf č. 1).

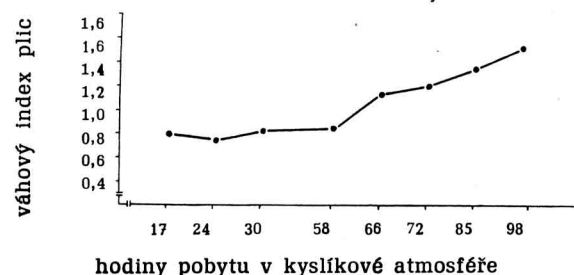
Hodnocení morfologických nálezů

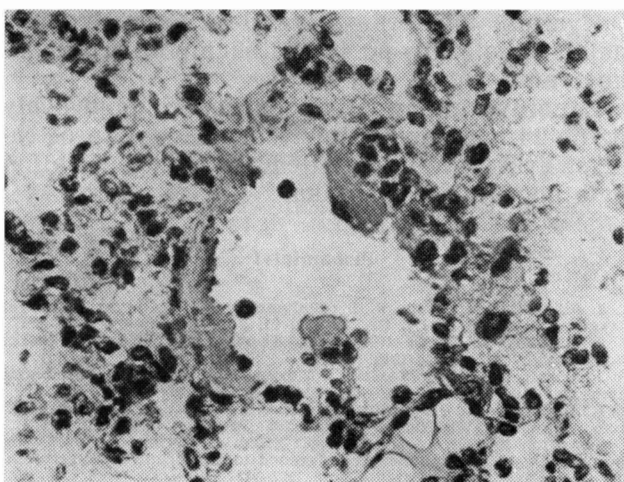
U živočichů utrácených v intervalu do 30 hodin nebyly nalezeny význačné makroskopické změny. Jen ojediněle byl nalezen v dutině hrudní výpotek a na povrchu plic drobná nevzdušná ložiska červené barvy. Zvířata jevila neklid a pobíhala po komoře.

U zvířat utrácených do 58—60 hodin jsme nalé-

zali na plicích většinou více drobných ložisek zkolabované tkáně tmavě červené barvy. Srdce Graf 1

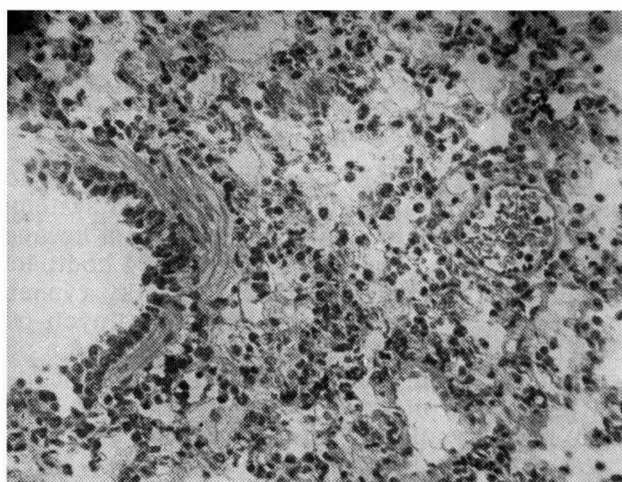
Změna váhového indexu plic $\left[\frac{\text{váha plic} \times 100}{\text{celková váha}} \right]$ morčat během dlouhodobé inhalace kyslíku





Obr. 3

Po 78 hodinách pobytu v kyslíkové atmosféře: hyalinní membrány vystylající některé alveoly s polymorfonukleáry v okolí (HE, 240×)



Obr. 4

Po 78 hodinách pobytu v kyslíkové atmosféře: konflující zánětlivý exsudát v alveolech plicních (HE, 120×)

bylo dilatováno, na játrech i ledvinách bylo výrazné překrvení. Morčata přestala přijímat potravu, pouze pila. Jevila nepatrnou aktivitu, pouze na vnější podráždění (úder na komoru) pobíhala.

U zvířat utrácených během 70.—80. hodiny byly na povrchu plic rozsety četné velké tmavočervené skvrny, na řezné ploše plic bylo patrné tmavočervené mramorování. Plíce vykazovaly obraz otoku plicního, okraje plic měly kompenzatorní emfyzém. Rovněž v průduškách a průdušnici byla zpěněná tekutina. V hrudní dutině jsme nacházeli čirý výpotek s hojným obsahem bílkovin, a to v různém množství, někdy zcela vyplňoval dutinu hrudní. V některých případech byl též obdobný výpotek v dutině perikardiální. Zvířata měla dyspnoe, na vnější podněty reagovala jen nepatrně. Dechové potíže se i po nepatrném pohybu zhoršovaly.

U zvířat, která byla utrácena později nebo zahynula v intervalu 98 až 112 hodin, byly těžké dyspnoické a ortopnoické potíže, později gasping. U zvířat spontánně zahynulých byly celé plíce nevzdušné, v průduškách i průdušnici bylo hojně zpěněné tekutiny. Plíce po ponoření do vody klesala ke dnu. U všech zvířat bylo v hrudní dutině velké množství výpotku, který dával silně pozitivní reakci s kyselinou sulfosalicylovou (++++). Srdce bylo výrazně dilatováno, zejména pravá polovina. Ostatní orgány jevíly výrazné překrvení.

V mikroskopickém obrazu jsme většinou nacházeli drobná či větší ložiska zkolabované plicní tkáně, která byla též často zánětlivě infiltrována. Na plicních kapilárách až na ojedinělé výjimky byla výrazná hyperémie. U některých zvířat bylo zjištěno výrazné krvácení do některých bronchů a skupin alveolů. U zvířat žijících déle než 72 hod. v kyslíkové atmosféře jsme výrazné krvácení nezjišťovali. Plicní edém byl zjišťován

ve většině případů, vícekrát u zvířat utrácených později. Byl buď ložiskový, nebo téměř splývající. Hyalinní membrány, a to velmi zřetelné s tinkčními vlastnostmi podobnými fibrinu, jsme našli nejdříve u zvířat utrácených za 48 hodin. Nejzřetelněji byly vytvořeny u zvířat utrácených za 78 a 80 hodin. Hyalinní membrány většinou byly provázány výskytem ložiskového nebo splývajícího edému a v jejich okolí byly často polymorfonukleáry. Převahu zánětlivých změn jsme nacházeli na plicním parenchymu, velmi málo výrazné a jen ojediněle byly zánětlivé změny na průduškách a průdušnici. U zvířat utrácených za 24—71 hodin jasně převažovaly zánětlivé změny v intersticiu plic, kde byly ložiskové zánětlivé infiltráty tvořené jak polymorfonukleáry, tak kulatými buňkami. Tato celulizace měla obvykle své maximum v perivaskulární a peribronchiální lokalizaci a podmiňovala výrazná rozšíření interalveolárních sept. Výraznější zánětlivý exsudát v alveolech jsme nacházeli u zvířat utrácených za 72 a více hodin, a to téměř vždy za přítomnosti zánětlivých změn též v intersticiu. Zánětlivé změny se vyskytovaly v plicích bez ohledu na to, zda zvířata dostávala antibiotika či nikoli.

Detailnější nálezy na ostatních orgánech budou vzhledem k histochemickým vyšetřováním též předmětem dalšího sdělení.

Bakteriologickým vyšetřením mikrobiální flóry z horních cest dýchacích u 15 morčat, namátkově vybraných před pokusem, byl u všech zjištěn *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus pyogenes* a *Streptococcus alfa*, u 6 *Neisseria* a *Corynebakterium pseudodiphtheriae* a u 3 *Escherichia coli*. Po 90—100 hodinách pobytu v kyslíkové atmosféře byl u utrácených nebo spontánně uhynulých morčat proveden bakteriologický rozbor plicní tkáně a obsahu střev. Při tom byla zjištěna pouze *Escherichia coli*, a to jak z plicní tkáně, tak i z obsahu střevního. Ostatní flóra,

zjištěná před pokusem, vymizela, a to jak u zvířat, jimž byla aplikována antibiotika, tak i u těch, jimž antibiotika aplikována nebyla.

Diskuse

Hyperémie plic při inhalaci kyslíku má za následek změnu permeability kapilárního systému v plicích. Objevuje se erytrodiapedéza a krvácení do alveolů a bronchů, a to již po 24 hodinách inhalace kyslíku. Tento nález má velký význam pro difúzi plynů, zejména kyslíku. V jiných pokusech jsme zjistili, že hyperémie spojené s poruchou kapilární permeability, jakož i se změnami prokrvení plic mají význam pro saturaci krve kyslíkem. Zatímco v plicním řečišti byla nalezena hyperémie, v mozkovém řečišti byla zjištěna vazokonstrikce (Lambertsen a spol., 1953, Ashton, 1954 aj.). Příčiny tohoto rozdílného mechanismu reakce cévních systémů v organismu jsou předmětem četných diskusí. Nejprůhodnějším názorem je, že zatímco hyperémie a venostáza, doprovázené dalšími změnami kapilár a alveolárních stěn, zhoršují difúzi pro kyslík, na druhé straně vazokonstrikce v mozkové tkáni chrání mozkové buňky proti velkému přívodu kyslíku. První patologické změny, které se pozorují při inhalaci kyslíku (hyperémie plicních kapilár, zánětlivé změny v intersticiu, krvácení do alveolů a bronchů, jakož i lokální kolaps tkáně), jsou způsobeny přímo vysokým dílčím tlakem kyslíku. Tyto změny se postupně rozšiřují na celou tkáň a kvantitativně narůstají. Objevuje se též edém plic a po 48 hodinách také hyalinní membrány. Po určité době tyto patologické změny dosáhnou takového stupně, že se styčná plocha plic pro saturaci krve kyslíkem začíná zmenšovat. Zatímco v tomto prvním období organismus trpí přímým toxickým účinkem vysokého dílčího tlaku kyslíku, v dalším období se postupně rozvíjí hypoxie a v posledních fázích zvířata hynou v anoxii. Odtud název „hyperoxická hypoxie“, který razil Bean (1945) a Žironkin (1956).

Z naší práce vyplývá důležitý poznatek, že nedochází k sekundární infekci plic tangovaných kyslíkem působením saprofytů nebo patogenních bakterií z horních cest dýchacích. Patologické změny na plicích u zvířat antibiotické skupiny i kontrolních skupin byly stejné a doba přežití všech tří skupin se od sebe nelišila.

Souhrn

V prostředí s 95–98 % kyslíku byly sledovány patologické změny, zejména na plicích, u skupiny 164 morčat. Dále byl zjišťován význam sekundární infekce působící na plíce poškozené kyslíkem.

Byl sledován časový vývoj patologických změn na plicích. Po 24hodinové inhalaci kyslíku byla pozorována hyperémie a krvácení do bronchů a alveolů. Plicní edém byl zjišťován též ve většině případů, výraznější byl u zvířat utracených později. Významný vzestup váhy plic byl pozorován již po 30 hodinách inhalace kyslíku.

Hyalinní membrány, vystýlající alveoly, byly nejdříve nalezeny po 48 hodinách pobytu v kyslíkové atmosféře.

Zánětlivé změny v plicích, které se objevovaly již po 24 hodinách pobytu v kyslíkovém prostředí, se vyskytovaly bez ohledu na to, zda zvířatům byla podávána antibiotika.

Písemnictví

1. Aikawa J. K., Bruns P. D.: Pulmonary lesions in experimental oxygen poisoning. *Am. J. Dis. Child.*, 91, 614, 1956.
2. Anthony A. J.: O₂ Inhalation. Über Sauerstoffatmung. *Dtsch. Med. Wschr.*, 66, 482–4, 1940.
3. Armstrong H. G.: Toxicity of oxygen at decreased barometric pressure. *Mil. Surgeon*, 83, 148, 1938.
4. Armstrong H. G.: The principles and practice of aviation medicine. Baltimore: Williams + Wilkins 1952, p 199.
5. Ashton N., Ward B., Serpell G.: Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Brit. J. Ophthalmol.*, 38, 397–432, 1954.
6. Ashton N., Cook Ch.: Direct observation of the effect of O₂ on developing vessels. *Brit. J. Ophthalmol.*, 38, 433–440, 1954.
7. Ashton N.: Pathological basis of retrolental fibroplasia. *Brit. J. Ophthalmol.*, 38, 385–396, 1954.
8. Bean J. W., Siegfried E. C.: Permanent motor disabilities induced by successive exposure to O₂ at high pressures. *Fed. Proc.*, 4, 1, 6, 1945.
9. Becker-Freyseng H.: Neue Untersuchungen über die Einwirkung hochkonzentrierter O₂ auf den Organismus. *Verhandlungen Dtsch. Ges. für Kreislaufforsch.*, 13, 83–85, 1940.
10. Becker-Freyseng H., Claman H. G.: *Klin. Wchschr.*, 18, 1382, 1939.
11. Behnke A. R., Johnson F. S., Poppen J. R., Motley E. P.: The effect of O₂ on man at pressure from 1 to 4 atm. *Am. J. Physiol.*, 110, 565–572, 1935.
12. Berfenstam R., Edlund T., Zettergren L.: The hyaline membrane disease. *Acta Paediatr.*, 47, 82, 1958.
13. Bert Paul: La pression barométrique. Paris 1878. Překlad: Hitchcock M. A., Hitchcock F. A., Collye Book, Comp., Columbus Ohio, 1943.
14. Binet L., Bochet M.: Les problèmes de la toxicité de l'oxygène. La tolerance de l'atmosphère suroxygénée à 60 %. *Presse Méd.*, 2, 48, 944, 1938.
15. Binger C. A. L., Faulkner J. H., Moor R. L.: Oxygen poisoning — in manuals. *J. Exper. Med.*, 45, 849, 1927.
16. Bornstein A., Stroink: Über Sauerstoffvergiftung. *Dtsch. Med. Wschr.*, 38, 32, 1495–7, 1912.
17. Cedergren B., Gyllenstein L., Wersäll L.: Pulmonary damage caused by oxygen poisoning: an electron microscopic study in mice. *Acta Paediatr. (Upps.)* 48, 477–94, 1959, 699.
18. Engel S.: The respiratory epithelium. *Acta anal.*, 29, 47, 1957.
19. Gerschman R., Gilbert D. L., Caccamise D.: Effect of various substances on survival tissues of mice exposed to different O₂ tension. *Am. J. Physiol.*, 192, 3, 563–71, 1958.
20. Giginov V. A., Žironkin A. G.: Vlijanije chron. ingalacii kislороda pri normal. davleniji na organ. životnych. *Fiziol. Ž. SSSR*, 28, 657, 1939.
21. Gitlin D., Craig G. M.: The nature of the hyaline membrane in asphyxia of the newborn. *Pediatrics*, 17, 64, 1956.
22. Grandpierre R., Grognot P.: Sur le mecanisme de production des lésions pulmonaires provoquées par l'inhalation d'oxygène pur. *J. de Physiol.*, Paris, 46, 375, 1954.
23. Ivanov I. M., Kravčinskij V. D., Prikladovickij S. I., Sonin V. R.: Toksičeskoe dějství vysokých davlení kislороda na životnyj organizm. *Fiziol. žurnal SSSR*, 17, 5, str. 1019–1034, 1934.
24. Johnson P. C., Bean J. W.: Effect of sympathetic blocking agents on the toxic action of O₂ at high pressure. *Am. J. Physiol.*, 188, 3, 593–98, 1957.
25. Karsner H. T.: The pathological effect of atmospheres rich in oxygen. *J. Exper. Med.*, 23, 149–170, 1916.
26. Kühn H. A.: Electrocardiographische und histologische Untersuchungen bei der Sauerstoffvergiftung. *Arch. für Kreislaufforschung*, 13, 6, 170–38, 1944.
27. Lambertsen C. J., Kough R. H., Cooper D. Y., Emmel G. L.: Loeschche H. H., Schmidt C. F.: Oxygen toxicity. Effects in man of oxygen inhalation at 1 and 3.5 atmospheres upon blood gas transport, cerebral circulation and cerebral metabolism. *J. Appl. Physiol.*, 5, 9, 471–486, 1953.
28. Pflesser G.: Beitrag zur Frage der Schädlichkeit des Sauerstoffs. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. f. Experiment. Pathol. u. Pharmacol.*, 187, 1, 472–78, 1937.
29. Pichotka J.: Über die histologischen Veränderungen der Lunge nach Atmung von hochkonzentriertem Sauerstoff im Experiment. *Beitr. z. Pathol. Anatomie*, 105, 381, 1941.
30. Pichotka J., Kühn H. A.: Experimentelle und morphologische Untersuchungen zur Sauerstoffvergiftung. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. f. Experiment. Pathol. u. Pharmacol.*, 204, 336–66, 1947.
31. Prikladovickij S. I.: Toksičeskoe dějství vysokých davlení kislороda na životnyj organizm. *Fiziol. žurnal SSSR*, 20, 3, 507–517, 1935.
32. Schmidt A., David O.: Zur Frage der Sauerstoffvergiftung. *Dtsch. Med. Wchschr.*, 38, 36, 1697, 1912.
33. Schulz H.: Über den Gestaltwandel der Mitochondrien in alveoläre Epithel unter CO₂ und O₂ Atmung. *Die Naturwissenschaften*, 43, 9, 205, 1956.
34. Smith F. J. C., Bennet G. A., Heim J. W., Thomson R. M., Drinker C. K.: Morphological changes in the lungs of rats living under compressed air conditions. *J. Exp. Med.*, 56, 79–89, 1932.
35. Smith F. J. C., Heim J. W., Thomson R. M., Drinker C. K.: Bodily

changes and development of pulmonary resistance in rats living under compressed air conditions. *J. Exper. Med.*, 56, 63–78, 1932.

36. Smidt L.: The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J. Physiol.*, 24, 1, 19–35, 1899.

37. Soulié P.: Sensibilité comparée des diverses espèces animales à l'action des inhalations prolongées d'oxygène à haute concentration. *L. R. Soc. Biol.*, 130, 210–539, 1939, *Soc. Biol.*, 130, 541, 1939.

38. Zilov G. N.: Vlijanie povyšenoj atm. davlenija na osnovnoj obmen čeloveka. Sbornik rabot po fiziol., I. Moskov. med. inst., Moskva 1939, str. 63–70.

39. Zilov G. N.: Gazoobmen životnych pri dlitel'nom prebyvanii ich v atm. s vysokim p Oz. Sbornik rabot po fiziol., I. Moskov. med. inst., Moskva 1939.

40. Žironkin A. G.: K analyzu dejstvija povyšenoj davlenija kislороda na organism. Dissertacija, Leningrad 1956.

41. Priestly J.: Experiments and observations relating to various branches of natural philosophy; with a continuation of the observations on air. Vol. 2, Johnson 1781, London.

42. Lavoisier A. L., Seguin A.: *Med. Acad. Sci.*, 158, 1789.

Poděkování:

Za provedení mikrobiologických rozborů výtěrů a tkání morčat děkujeme dr. F. Třískovi z Ústavu pro lék. mikrobiologii a imunologii KU.