

**MORPHOMETRIC STUDY ON THE LESIONS IN THE TRACHEA WALL IN RATS IN HYPERBARIC OXYGEN THERAPY****BADANIA MORFOMETRYCZNE ZMIAN W ŚCIANIE OSKRZELI U SZCZURÓW W HIPERBARII TLENOWEJ**

Piotr Siermontowski<sup>1)</sup>, Maciej Konarski<sup>1)</sup>, Agnieszka Pedrycz<sup>2)</sup>, Tomasz Wojtowicz<sup>1)</sup>, Katarzyna Ostapowicz van Damme<sup>3)</sup>, Maciej Kulig<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Maritime and Hyperbaric Medicine Department, Military Institute of Medicine, Gdynia

<sup>1)</sup> Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej Wojskowego Instytutu Medycznego w Gdyni

<sup>2)</sup> Histology and Embryology Department with the Experimental Cytology Laboratory of Medical University in Lublin

<sup>2)</sup> Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

<sup>3)</sup> Department of Integrated Medical Care, Medical University of Białystok

<sup>3)</sup> Zakład Zintegrowanej Opieki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

<sup>4)</sup> Department of Internal Medicine and Rheumatology, Military Institute of Medicine in Warsaw

<sup>4)</sup> Klinika Chorób Wewnętrznych i Reumatologii, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

**ARTICLE INFO**

**Journal:** PolHypRes 2013 Vol. 43 Issue 2 pp. 7 – 22

**ISSN:** 1734-7009

**eISSN:** 2084-0535

**DOI:** HTTP://DX.DOI.ORG/10.13006/PHR.43.1

Pages: 15, figures: 3, tables: 0

**page www of the periodical:** www.phr.net.pl

**Research financed from an academic grant KBN/NCN No. NN 404 109 739**

**Badania finansowane z grantu nr. KBN/NCN No. NN 404 109 739**

**Keywords/Słowa kluczowe:**

*(in English):* Oxygen, hyperbaria, morphometrics, trachea

*(in Polish):* tlen, hiperbaria, morfometria, tchawica

**Polish-English bilingual publication****Publisher**

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society

**ABSTRACT**

*(in English)*

Clinical observations and experimental research results prove the toxic effect of oxygen on the respiratory tract both in normo- and hyperbaria. The majority of available studies concern changes in the lung parenchyma, only some of them refer to the impact of hyperbaric oxygen on the respiratory tract. The objective of the study based on an animal model was to provide an evaluation of the effect of overpressure of exhaled oxygen (oxygen hyperbaria) and the time of its duration on morphological changes in the mucous and submucous membranes of the trachea. Oxygen hyperbaria corresponding to the depth of 5 – 7 metres induces temporary motor agitation and increased aggression in rats lasting from 3 to 20 minutes. Further rises of oxygen pressure cause a reduction of the agitation, whereas at the depth of 40 m it results in extreme weakening of the breathing activity and leads to the animals' death. Growing oxygen hyperbaria causes thickening of both the mucous and submucous membranes of the rats' trachea accompanied by narrowing of its lumen. The changes are intensified with prolonged duration of hyperbaric oxygen therapy.

The most serious morphological changes were observed in the submucous membrane of the trachea. The dominant lesion consisted of an interstitial oedema with the widening of the vascular bed. Progressing hyperbaria caused thickening of the mucous and submucous membranes with a simultaneous reduction of the trachea lumen. Similar tendencies persisted with prolonged duration of hyperbaria.

*(in Polish)*

Obserwacje kliniczne oraz wyniki badań doświadczalnych dowodzą toksycznego działania tlenu na drogi oddechowe zarówno w normo - jak i hiperbarii. Większość dotychczasowych opracowań dotyczy zmian w miąższu płucnym, tylko pojedyncze odnoszą się do wpływu hiperbarii tlenowej na drogi oddechowe. Celem badań własnych na modelu zwierzęcym, była ocena wpływu nadciśnienia tlenu wdychanego (hiperbarii tlenowej) i czasu stosowania tego nadciśnienia na zmiany morfologiczne w błonie śluzowej i włóknistej tchawicy. Hiperbaria tlenowa odpowiadająca głębokości do 5 - 7 metrów wywołuje u szczurów przejściowe, trwające od 3 do 20 minut pobudzenie ruchowe i zwiększenie agresywności. Dalsze zwiększanie ciśnienia tlenu powoduje zmniejszenie ich ruchliwości, a na głębokości do 40 m doprowadza do ekstremalnego osłabienia oddychania i padania zwierząt. Narastanie hiperbarii tlenowej powoduje u szczurów

pogrubienie zarówno błony śluzowej jak i włóknistej tchawicy, przy równoczesnym zwężeniu jej światła. Zmiany te narastają wraz z wydłużaniem czasu działania hiperbarii tlenowej. Wśród tych zmian dominował obrzęk śródmiąższowy z poszerzeniem łożyska naczyniowego. W miarę narastania hiperbarii obserwowano pogrubienie błony śluzowej i włóknistej, przy równoczesnym zmniejszaniu się światła tchawicy. Podobne tendencje utrzymywały się wraz z narastaniem czasu działania hiperbarii.

The summary in Russian on end of the publication

## WSTĘP

Jednym z paradoksów życia w warunkach atmosfery tlenowej jest fakt, że chociaż tlen jest niezbędny ludziom i zwierzętom do podtrzymania procesów życiowych, to równocześnie oddychanie przetlenioną atmosferą przez dłuższy okres czasu może być szkodliwe, a nawet zabójcze. Efekt ten, znany od ponad stu lat dzięki badaniom J.L. Smith'a [23] jest szczególnie zauważalny w przypadku ekspozycji organizmu na zwiększone ciśnienie otoczenia, co zgodnie z fizyką gazów skutkuje narażeniem na oddziaływanie podwyższonych wartości ciśnienia cząstkowego tlenu.

Stopień narażenia na zatrucie  $O_2$  wzrasta proporcjonalnie do narastania jego ciśnienia cząstkowego we wdychanej mieszaninie gazowej i wydłużania czasu ekspozycji. Przy odpowiednio wysokim ciśnieniu i czasie trwania ekspozycji tlen może powodować narastające upośledzenie czynności, aż do poważnego chemicznego uszkodzenia, a nawet zniszczenia każdej żywej komórki.

Chociaż konkretne reakcje nie są do końca poznane, obecnie przyjmuje się powszechnie, że efekty toksycznego działania tlenu powstają w mechanizmie generowania jego reaktywnych form i oddziaływań wzajemnych z sąsiadującymi strukturami komórkowymi, co prowadzi do określonych deficytów czynnościowych i morfologicznych [9,10,12], w czym według najnowszych badań współuczestniczy tlenek azotu (NO) i jego pochodne [1,8].

Kiedy zdrowe zwierzę lub człowiek jest ekspozycjonowany na tlen pod toksycznym ciśnieniem cząstkowym, kolejność występowania i ciężkość obserwowanych objawów w różnych narządach i tkankach zależy od ich relatywnej wrażliwości na tlen hiperbaryczny oraz dawki  $O_2$ . Dawka tlenu dla konkretnej tkanki determinowana jest równowagą, jaka istnieje pomiędzy czynnikami takimi, jak tętnicze ciśnienie cząstkowe tlenu, wielkość przepływu krwi, aktywność metaboliczna tkanki oraz gęstość krążenia włókniczkowego.

Ponieważ czynniki te nie są jednolite dla całego organizmu, konkretne narządy i tkanki poddawane są ekspozycji na  $O_2$  w bardzo szerokich zakresach stężeń podczas oddychania tym gazem przy danym ciśnieniu [17]. Tlen, oprócz lepiej znanego i bardziej spektakularnego oddziaływania toksycznego na ośrodkowy układ nerwowy, manifestującego się między innymi drgawkami tlenowymi, wykazuje także toksyczne działanie w stosunku do układu oddechowego – stąd klasycznie wyróżnia się dwa zespoły kliniczne zatrucia: postać mózgową i postać płucną, nazywaną również zatruciem tlenowym płuc. Tlen wykazuje właściwości toksyczne w stosunku do mięszu płuc, gdy ciśnienie cząstkowe tego gazu oddziałujące na organizm przekroczy wartość 50 kPa [3]. Do głównych objawów tej formy zatrucia należą: suchy kaszel, uczucie pieczenia w górnych drogach oddechowych i klatce piersiowej, dyskomfort oddechowy, kłopoty z wykonaniem pełnego wdechu, zwiększenie oporów oddechowych, itp.

O ile z dostępnych prac dużo jest wiadomo o mechanizmach i następstwach zatrucia tlenowego na poziomie składowych mięszu płucnego, to jest pęcherzyków płucnych, przewodów pęcherzykowych oraz drobnych oskrzeli [2,3,5,11], o tyle problematyczne jest znalezienie prac (a szczególnie współczesnych) traktujących o patologii w zakresie pośredniego piętra dróg oddechowych, to jest dużych oskrzeli i tchawicy.

## INTRODUCTION

One of the paradoxes of life in the conditions of an oxygen atmosphere is the fact that, despite oxygen being indispensable in sustaining vital processes in both humans and animals, breathing an overoxygenized atmosphere for an extended period of time may prove to be harmful or even fatal. This effect, known for over a hundred years thanks to the research conducted by J.L. Smith [23], is especially noticeable in the case of an organism's exposure to increased pressure, which in accordance with the physics of gases results in the risk of exposure to increased oxygen partial pressure.

The level of exposure to O<sub>2</sub> toxicity increases proportionately to the increase of its partial pressure in the inhaled gas mixture and the prolongation of the exposure time. Given a high enough pressure, accompanied by adequate exposure time, a growing impairment of the vital processes leading to serious chemical damage or even destruction of every living cell may occur. Although specific reactions are not known, currently it is commonly believed that the effects of oxygen toxicity result from the activation of the mechanism of generating reactive forms of oxygen and mutual interactions with neighbouring cellular structures, which cause particular functional and morphological deficits [9,10,12] with the participation of nitric oxide (NO) and its derivatives, as has been found by the most recent studies [1,8].

When a healthy animal or human is exposed to oxygen under toxic partial pressure, the sequence of occurrence and severity of symptoms observed in various organs and tissues will depend on their relative sensitivity to hyperbaric oxygen as well as O<sub>2</sub> dose. Oxygen dose for a particular tissue is determined with the balance between such factors as arterial oxygen partial pressure, blood flow, metabolic activity of the tissue and capillary circulation density. As these conditions are not the same for the entire organism, particular organs and tissues are subjected to oxygen exposure in very broad concentration ranges in which this gas is being inhaled in a given pressure [17].

Oxygen, besides having a more familiar and more spectacular toxic effect on the central nervous system, manifested, among other things, by seizures, also reveals a toxic activity in relation to the respiratory system: a cerebral and a pulmonary form, also known as pulmonary oxygen toxicity. Oxygen shows toxic properties in relation to lung parenchyma when the partial pressure of this gas exceeds the value of 50 kPa [3]. The main symptoms of this form of poisoning include: dry cough, burning sensation in the upper respiratory tract and the chest, respiratory discomfort, problems with taking a full breath, increase of respiratory obstruction, etc.

Although there is a multitude of available works on the mechanisms and consequences of oxygen toxicity on lung parenchyma, i.e. on pulmonary alveoli, alveolar ducts and the small bronchi [2, 3, 5, 11], it is rather problematic to find studies (especially recent ones) on the pathology of the middle part of the respiratory tract, i.e. the large bronchi and the trachea. With regard to pulmonary toxicity, researchers tend to focus on the observations of measurable effects of the development of this type of toxicity to the lower part of the respiratory system: (intense) reduction of the working capacity of the lungs, reduction of lung flexibility, flow impairment in the small bronchi and bronchioles, and finally the measureable consequences of gas exchange impairment at the level of a pulmonary alveolus.

In the available literature, the references concerned with the pathology of the large bronchi and the trachea – particularly from the morphometric point of view – usually take the form of a single-sentence statement rather than a longer discussion. It is commonly assumed that the flow dysfunction of the respiratory tract and the accompanying obstruction do not result from pathologies of the large bronchi and the trachea [8,17].

All of the above became our incentive to undertake experimental research on an animal model.

W aspekcie tlenowej toksyczności płucnej badacze skupiają swoją uwagę na obserwacjach, dotyczących mierzalnych następstw rozwijania się tego typu toksyczności w stosunku do dolnego piętra układu oddechowego: obniżenia (natężonej) pojemności życiowej płuc, zmniejszenia specyficznych własności elastycznych płuc, upośledzenia przepływu w drobnych oskrzelach i oskrzelikach, w końcu mierzalnym następstwem upośledzenia wymiany gazowej na poziomie pęcherzyka płucnego.

W dostępnym piśmiennictwie wzmianki na temat patologii w zakresie dużych oskrzeli i tchawicy – szczególnie od strony morfometrycznej – funkcjonują raczej na zasadzie jednozdaniowych stwierdzeń, niż szerszej dyskusji. Generalnie przyjęte jest, że obserwowane wskutek narastającego zatrucia tlenowego zaburzenia przepływu w drogach oddechowych i towarzyszące temu zjawisku zwiększenie oporu dróg oddechowych nie zależą od patologii w zakresie oskrzeli większego kalibru i tchawicy [8,17].

Skłoniło to nasz zespół do podjęcia badań doświadczalnych na modelu zwierzęcym.

### **CEL PRACY**

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu ciśnień parcjalnych tlenu wyższych niż 1 ATA w różnych czasach oddziaływania na obraz morfologiczny ściany tchawicy.

### **MATERIAŁ I METODA**

Badania przeprowadzono w skonstruowanej specjalnie dla małych zwierząt, którymi były szczury rasy Black Hood, komorze wysokociśnieniowej. Przed właściwą ekspozycją hiperbaryczną zwierzęta oswajano ze środowiskiem komory poprzez umieszczanie ich w jej wnętrzu przez 5 dni z rzędu na okres od 30 do 120 minut.

W tym czasie były one przyzwyczajane również do hałasu, jaki powstaje podczas wtłaczania mieszaniny gazowej do komory.

Miało to na celu minimalizację ewentualnych artefaktualnych zmian morfologicznych związanych ze stresem.

W pierwszej fazie badań makroskopowych i mikroskopowych każda grupa doświadczalna była podzielona na dwie podgrupy, w zależności od płci zwierzęcia. Jednak już wstępna analiza wyników pozwoliła na stwierdzenie, że uzyskiwane wartości nie są zależne od płci, co pozwoliło traktować zwierzęta obu płci jako jedną grupę badaną.

Materiał na którym przeprowadzono badania stanowiło 48 szczurów. Zwierzęta podzielono na grupy, w zależności od czasu ekspozycji (1, 2 i 4 godz.) i stosowanego nadciśnienia (0,5, 1 lub 2 AT). Zwierzęta umieszczano w komorze po 3 sztuki, łącznie w każdej grupie badanej było 6 zwierząt. Po zamknięciu wjazdu wykonywano płukanie komory tlenem celem usunięcia powietrza.

Następnie podnoszono ciśnienie w komorze z prędkością 1 AT na minutę aż do osiągnięcia ciśnienia zaplanowanego dla danego profilu ekspozycji. W chwili osiągnięcia maksymalnego ciśnienia profilu rozpoczynano odliczanie czasu ekspozycji. Podczas wszystkich ekspozycji wykonywano płukania komory czynnikiem oddechowym wedle wyliczonej procedury zapewniającej stały poziom tlenu i dwutlenku węgla w komorze. Dekompresję ciąglą wykonywano z prędkością 0,5 AT na minutę aż do osiągnięcia ciśnienia atmosferycznego. Następnie komorę otwierano i wyjmowano zwierzęta.

W związku z padnięciem wszystkich zwierząt podczas ekspozycji przy nadciśnieniu 2 AT z czasem pobytu 2 godziny, nie przeprowadzono ekspozycji dla tego samego nadciśnienia i czasu 4 godziny.

Bezpośrednio po doświadczeniu szczury uśmiercano przez przerwanie ciągłości rdzenia kręgowego i poddawano badaniu patomorfologicznemu makroskopowemu. Po rozcięciu powłok szyi, wypreparowywano tchawicę, podwiązywano ją w dwóch miejscach celem niedopuszczenia do zapadnięcia się płuc po otwarciu klatki piersiowej, następnie wydobywano w całości pakiet narządów klatki piersiowej.

## OBJECTIVE

The objective of the conducted studies was to determine the impact of the values of oxygen partial pressure exceeding 1 ATA with various exposure times on the morphological image of the walls of the trachea.

## MATERIAL AND METHOD

The research was carried out in a specially constructed hyperbaric chamber for small animals, in this case Black Hood rats. Before the exposure the animals were accustomed with the chamber by spending there from 30 to 120 minutes daily for five consecutive days. During that time they were also familiarized with the noise accompanying the process of filling the chamber with the gas mixture with the purpose of minimizing possible artefactual morphological changes due to stress.

In the first stage of macroscopic and microscopic examinations each experimental group was divided into two subgroups, depending on animals' sex. However, already the initial analysis of results allowed to conclude that the obtained values were not related to sex and so all the animals were treated as one experimental group.

The experiment was carried out on 48 rats. The animals were divided into groups with regard to exposure duration times (1, 2 and 4 hours) and the applied overpressure (0.5, 1 or 2 AT). The animals were placed in the chamber in groups of 3; cumulatively each group consisted of 6 animals. After closing the hatch the chamber was flushed with oxygen in order to purge the system of air. Next, the pressure in the chamber was increased with the speed of 1 AT per minute until reaching the pressure planned for a given exposure profile. At the point when the maximum pressure was reached the measurement of exposure time was commenced. Throughout the experiment, the atmosphere within the chamber was controlled, ensuring a breathing mix in accordance with a calculated procedure, giving constant oxygen and carbon dioxide levels. Continuous decompression was performed at the pace of 0.5 AT per minute until reaching atmospheric pressure. Next, the chamber was opened and the animals were removed.

Since all animals exposed to an overpressure of 2 AT combined with a stay time of 2 hours died in the chamber, the decision was made not to perform the exposure with the same overpressure and the stay time of 4 hours.

Immediately after the experiment the rats were put to death by breaking the continuity of the spinal cord and subjected to patho-morphological macroscopic examination. After the dissection of the neck area, two ligatures were provided around the trachea in order to prevent lung collapse after opening the chest.

Next, the entire set of organs was removed from the chest. The organs were immersed in 200 ml of 10% neutralized formalin and fixed at a temperature of 4°C, the contents of the containers being clearly identified by a label. Microscopic specimens were prepared via the paraffin method. Sections of the trachea situated below the ligatures and directly over the branching to the main bronchi were obtained from each animal. Tissue scraps of 5 micrometres were prepared with the use of microtome and stained with haematoxylin-eosin in a typical manner. The specimens were subjected to qualitative and quantitative examination with the use of a 121-point Haug's grid. Calculations were made with the use of 20x magnification. In these examinations the number of transection points with grid lines in the lumen of the trachea, mucous membrane and the remaining components of the wall of the trachea (submucous membrane with bronchial cartilage) was identified.

Pakiety narządów umieszczono w oznaczonych, 200 ml pojemnikach, zawierających roztwór 10% zubożonej formaliny i utrwalono w temperaturze 4%. Preparaty mikroskopowe wykonywano metodą parafinową. Od każdego zwierzęcia uzyskiwano przekroje tchawicy pobierane poniżej podwiązek i bezpośrednio nad rozwidleniem na oskrzela główne. Skrawki tkankowe grubości ok. 5 mikrometrów sporządzano przy użyciu mikrotomu i barwiono hematoksyliną-eozyną w sposób typowy. Przy pomocy tych preparatów wykonywano badania jakościowe i ilościowe z zastosowaniem 121-punktowej siatki Hauga. Zliczeń dokonywano przy powiększeniu 20x.

W badaniach tchawicy zliczano liczbę trafień skrzyżowań linii siatki w światło tchawicy, błonę śluzową i pozostałe składniki ściany tchawicy (błona włóknista wraz z chrząstkami oskrzelowymi). W przypadku pomiarów tchawicy nie było możliwości takiego ustawienia metody, aby cała siatka Hauga pokrywała struktury anatomiczne, w związku z czym sumaryczna liczba trafień była różna w każdym pomiarze.

Z uzyskanych wyników wyliczono współczynniki stosunku:

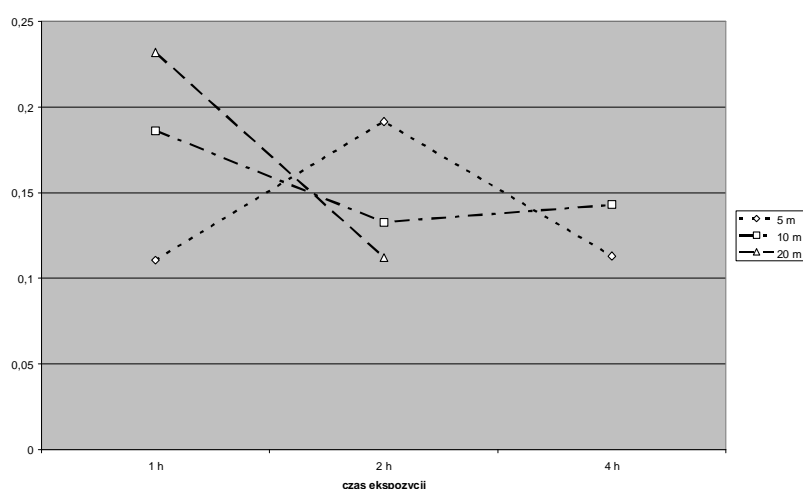
- powierzchni światła tchawicy do powierzchni błony śluzowej,
- powierzchni światła tchawicy do powierzchni błony włóknistej,
- powierzchni całego przekroju ściany tchawicy do powierzchni jej światła.

## WYNIKI

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że oddychanie przez zwierzęta doświadczalne tlenem pod zwiększonym ciśnieniem istotnie wpływa na zmiany pól przekrojów zarówno całego światła tchawicy, jak i poszczególnych warstw jej ścian. Zmiany każdego ze współczynników zależą zarówno od czasu ekspozycji, jak i od wartości oddziałującego nadciśnienia tlenu.

Stosunek pola przekroju światła tchawicy do pola przekroju błony śluzowej zmienił się na niekorzyść światła tchawicy dla nadciśnień większych, niż równoważne 5 mH<sub>2</sub>O (0.5 AT). Natomiast w przypadku grupy badanej eksponowanej na nadciśnienie równoważne 5 mH<sub>2</sub>O obserwowano początkowy wzrost stosunku pola powierzchni przekroju na korzyść światła tchawicy, a dopiero od drugiej godziny ekspozycji spadek. Uzyskane wyniki przedstawia rysunek 1.

Różnice wartości – z wyjątkiem grupy eksponowanej na nadciśnienie równoważne 10 mH<sub>2</sub>O (1 AT) z czasem 2 i 4 godziny – były znamienne statystycznie.



Rys. 1. Zmiany stosunku pola powierzchni światła tchawicy do pola powierzchni przekroju błony śluzowej.

In the case of measurements on the trachea it was not possible to ensure such a setting of the Haug's grid so that all anatomical structures could be covered, as a result of which the summary number of hits was different in each measurement.

The obtained results allowed to calculate relations between:

- the area of the lumen of the trachea and the mucous membrane area,
- the lumen of the trachea and the area of submucous membrane,
- the area of the entire section of the wall of the trachea and the area of its lumen.

## RESULTS

The obtained results allow to conclude that oxygen, breathed by animals' under an increased pressure, significantly influences changes in both the section areas of the whole trachea lumen and the particular layers of its walls. Changes in each coefficient depend both on exposure time and oxygen overpressure value.

The relations between the section area of the trachea lumen and the section area of the mucous membrane changed to the disadvantage for the trachea lumen in higher overpressures than the overpressure equivalent to 5 mH<sub>2</sub>O (0.5 AT). Whereas in the case of the group exposed to the overpressure equivalent to 5 mH<sub>2</sub>O, an initial growth in the relation between the section area to the advantage of the trachea lumen was observed, followed by a decrease in the second hour of the exposure. The results are presented in fig. 1. The differences in values – with the exception of the group exposed to the overpressure equivalent to 10mH<sub>2</sub>O for 2 and 4 hours – were statistically significant.

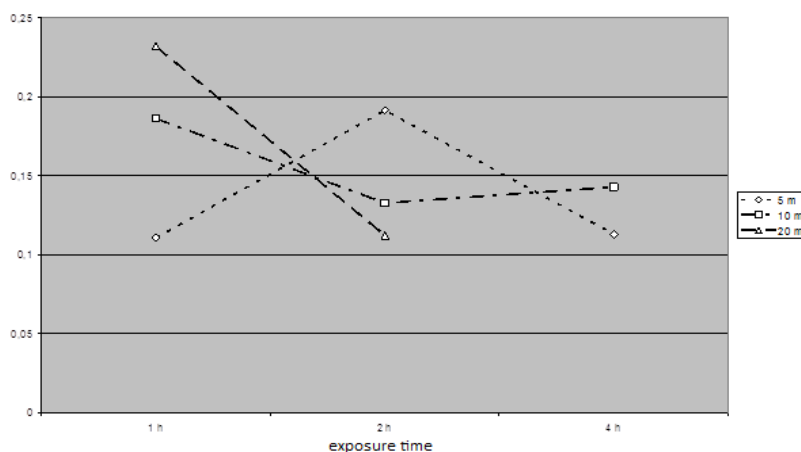
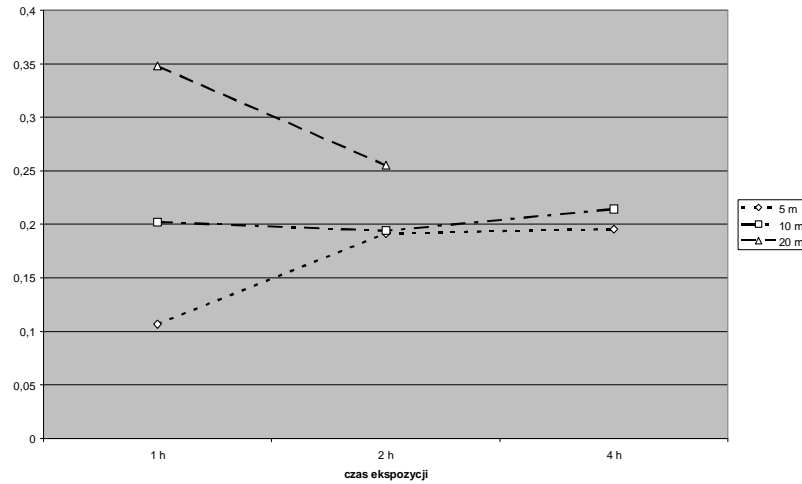


Fig. 1. Changes in the relation between the trachea lumen area and the section area of the mucous membrane.

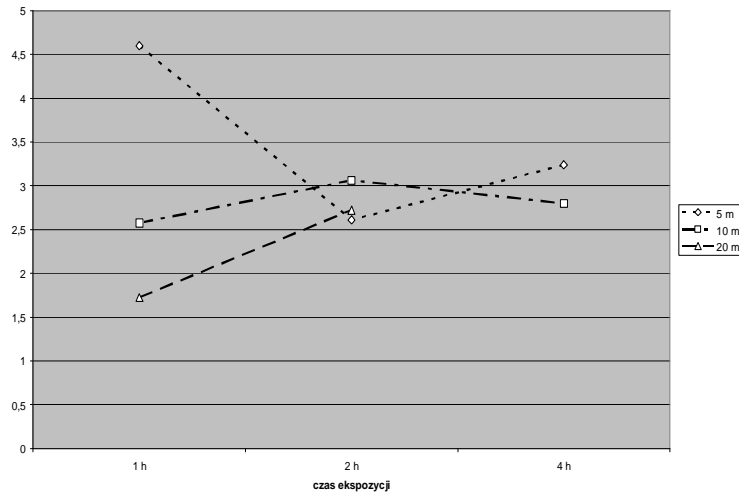
Changes in the relations between the areas of the trachea lumen area and the submucous membrane were analogous to the mucous membrane area. Differences in the achieved values also were statistically significant with the same exception as it was the case with the mucous membrane. The results are shown in fig. 2.

Zmiany stosunku pól powierzchni światła tchawicy i błony włóknistej zachowywały się analogicznie, jak błony śluzowej. Różnice uzyskanych wartości były również znamienne statystycznie, z tym samym wyjątkiem, co w przypadku błony śluzowej. Uzyskane wartości przedstawia rys. 2.



Rys. 2. Zmiany stosunku pola powierzchni światła tchawicy do pola powierzchni przekroju błony włóknistej.

Obserwowane dla poszczególnych warstw ściany tchawicy kierunki zmian potwierdziło „odwrotne” porównanie stosunku pola powierzchni światła do pola powierzchni przekroju całej ściany tchawicy. Tu również widoczne było zróżnicowanie reakcji w zależności od wartości nadciśnienia  $O_2$  i czasu ekspozycji. Uzyskane wartości przedstawia rys. 3.



Rys. 3. Zmiany stosunku pola powierzchni światła do pola powierzchni przekroju całej ściany tchawicy.



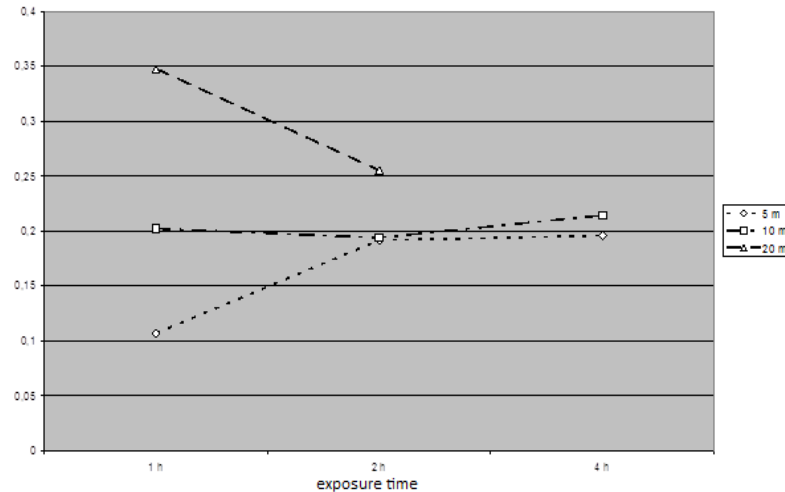


Fig. 2. Changes in the relation between the area of the trachea lumen and the section area of submucous membrane.

The observed direction of changes for particular layers of the trachea wall was confirmed by 'reversed' juxtaposition of the relation between the trachea lumen area and the section area of the entire trachea wall. In this case it was also possible to observe a variety of reactions depending on the value of  $O_2$  overpressure and exposure time. The results are presented in fig. 3.

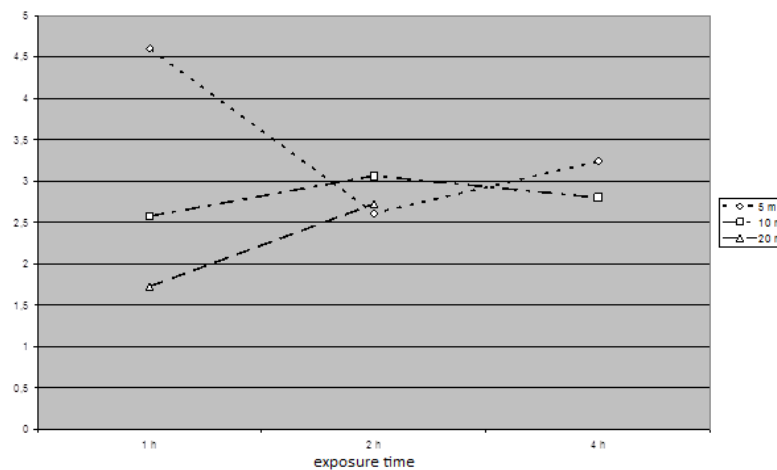


Fig. 3. Changes in the relation between the lumen area and the section area of the entire trachea wall.

## DISCUSSION OF RESULTS

In numerous research studies, particularly recent ones, the major focus is placed on the correlation of routinely controlled measurable lung capacity parameters, such as (F)VC, FEV<sub>1</sub>, PEF, FEF, D<sub>L</sub>CO or R<sub>aw</sub> and the previously enumerated clinical exponents of pulmonary oxygen toxicity – while at least some of them, such as dry cough or a burning sensation in the respiratory tract are not easily explained by pathology in the lower section of the respiratory system. From a very interesting study by B. Shykoff from the Navy Experimental Diving Unit, published within the last decade [18, 19, 20, 21, 22] it stems that clinical symptoms during and after long lasting exposures to an increased oxygen partial pressure ( $p_{iO_2} = 1.4-1.6$  ATA with the exposure time of 6-8 h) constitute a more sensitive indicator of growing pulmonary oxygen toxicity in divers than changes in the commonly controlled measurable parameters of lung activity [18, 20, 21].

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

W bardzo wielu pracach badawczych, szczególnie aktualnych, wielki nacisk kładzie się na korelację rutynowo badanych mierzalnych parametrów czynności płuc, najczęściej (F)VC, FEV<sub>1</sub>, PEF, FEF, D<sub>L</sub>CO czy R<sub>aw</sub>, z wymienionymi wcześniej klinicznymi wykładnikami postaci płucnej zatrucia tlenem – a przynajmniej niektóre z nich, jak suchy kaszel czy uczucie pieczenia w drogach oddechowych raczej trudno wytłumaczyć tylko patologią w zakresie dolnego odcinka układu oddechowego.

Z niezwykle interesujących badań B. Shykoff z Navy Experimental Diving Unit, opublikowanych na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat [18,19,20,21,22] wynika, że objawy kliniczne podczas i po długotrwałych ekspozycjach na zwiększone ciśnienie cząstkowe tlenu (p<sub>i</sub>O<sub>2</sub> = 1.4-1.6 ATA przy czasie ekspozycji 6-8 h), są czulszym wskaźnikiem narastającego zatrucia tlenowego płuc u nurków, niż zmiany w zakresie standardowo ocenianych mierzalnych parametrów czynności płuc [18,20,21].

Porównując wyniki badań własnych z danymi z piśmiennictwa można stwierdzić, że efekty narastającego zatrucia tlenowego, obserwowane przez innych badaczy głównie na poziomie oskrzelików i miąższu płuc, przy odpowiednio skrajnych warunkach narażenia na oddziaływanie tlenu hiperbarycznego – w naszym przypadku, odpowiednio, przy p<sub>i</sub>O<sub>2</sub> = 2.0 lub 3.0 ATA i przy czasie ekspozycji 2 lub 4 h – w zakresie dużych oskrzeli i tchawicy skutkują zmniejszeniem efektywnego światła dróg oddechowych i obrzękiem błony śluzowej, a w przypadku nadciśnienia równoważnego 20 mH<sub>2</sub>O również błony włóknistej. W aspekcie przytoczonych wcześniej wyników badań z udziałem ludzi, prowadzonych zazwyczaj przy mniejszym p<sub>i</sub>O<sub>2</sub>, a skutkujących konkretnymi objawami klinicznymi u większości badanych, trudno nie powziąć przekonania, iż obserwowane przez nasz zespół zmiany morfometryczne u zwierząt doświadczalnych są prostą pochodną narastającego zatrucia tlenowego. Istotne znaczenie wydają się tu mieć opisane kilka lat temu przez Demchenko i wsp. [8] zależności wynikające z oddziaływań metabolicznych tlenku azotu (NO): wysokie wartości pO<sub>2</sub> przyspieszają produkcję NO przez endotelialną syntazę NO (eNOS) w śródbłonku naczyniowym i przez neuronalną syntazę NO (nNOS) w zakończeniach nerwowych, skutkując „przełączeniem” indukowanej tlenową ekspozycją hiperbaryczną wazokonstrykcji w kierunku poszerzenia światła naczyń krwionośnych i następczego przekrwienia błony śluzowej dróg oddechowych. Mechanizmy te jako naprawcze po respiratoroterapii tlenowej opisywał także Curley i wsp. [7]

Warto w tym miejscu dodać, że będący w ostatnich latach w centrum zainteresowania różnych zespołów badawczych NO-zależny mechanizm toksyczności tlenowej w hiperbarii, świetnie wyjaśnia zjawisko padnięcia wszystkich zwierząt doświadczalnych przy p<sub>i</sub>O<sub>2</sub> = 3.0 ATA i czasie ekspozycji 2 h [1,8].

Niekorzystne następstwa oddziaływania tlenu normobarycznego i hiperbarycznego na płuca i mózg są w świetle najnowszych koncepcji integralnymi składowymi patofizjologicznego kontinuum, którego elementem wspólnym jest NO i jego interakcje z innymi biochemicznie aktywnymi substancjami (jonami, wolnymi rodnikami, itp.) o udowodnionym znaczeniu w patogenezie toksyczności tlenowej. Stąd nie budzi zdziwienia znalezienie w drogach oddechowych szczurów padłych podczas ekspozycji wykładników morfologicznych ostrego zatrucia tlenowego pomimo, iż wyjściową przyczyną ich śmierci była niewątpliwie tlenowa toksyczność mózgowa.

Według naszej opinii, potwierdzają to również wyniki uzyskane przy p<sub>i</sub>O<sub>2</sub> = 1.5 ATA – to jest ciśnieniu cząstkowym oddziaływującego tlenu na poziomie zbliżonym do stosowanych w większości z cytowanych prac badawczych z udziałem ludzi. W przypadku tego rzędu wielkości p<sub>i</sub>O<sub>2</sub> najistotniejszym czynnikiem decydującym o rozwinięciu się objawów zatrucia tlenowego jest czas ekspozycji – i taka właśnie zależność jest łatwa do zaobserwowania w prezentowanych wynikach badań własnych, w przypadku wydłużenia czasu ekspozycji hiperbarycznej do 4 h.

The juxtaposition of the results obtained in the course of own studies, and the data available in literature, allows to conclude that the effects of a growing oxygen toxicity observed by other researchers, mainly at the level of bronchioles and lung parenchyma in adequately extreme conditions of exposure to hyperbaric oxygen – in our case in  $p_{iO_2} = 2.0$  or  $3.0$  ATA and exposure times of 2 or 4 hours respectively – in the area of the large bronchi and the trachea, resulted in a reduction of the effective lumen of the respiratory tract and a swelling of the mucous membrane, and in the case of overpressure equivalent to  $20 \text{ mH}_2\text{O}$  also of the submucous membrane. In the context of earlier quoted studies with humans, usually carried out with lower  $p_{iO_2}$ , and resulting in concrete clinical symptoms in the majority of patients, it is rather clear that the morphometric changes in experimental animals observed by our team constitute a simple derivative of an increasing oxygen toxicity. What seems to be significant here are the relationships resulting from metabolic interactions with nitric oxide (NO) described several years ago by Demchenko and others [8]: high  $pO_2$  values accelerate NO production by endothelial NO synthase (eNOS) in vascular endothelium and by neuronal NO synthase (nNOS) in nerve endings causing a 'switch' of the vasoconstriction induced by an exposure to hyperbaric oxygen towards widening of the lumen of blood vessels and plethora of the mucous membrane of the respiratory tract. These mechanisms were described as repair mechanisms following respiratory therapy by Curley and others [7].

At this point, it is worth mentioning that the recent interest of various research teams in the NO-dependent mechanism of oxygen toxicity in hyperbaria brought about an explanation for the death of all experimental animals at  $p_{iO_2} = 3.0$  ATA and the exposure time of 2 h [1.8]. Unfavourable effects of normobaric and hyperbaric oxygen on the lungs and brain in the light of the most recent concepts constitute integral parts of a patho-physiological continuum with NO as a common element with its interactions with other biochemically active substances (ions, free radicals, etc.) of proven significance in oxygen toxicity pathogenesis.

Thus, finding morphological exponents of acute oxygen poisoning in the respiratory tracts of rats that died during the exposure is far from surprising, even though the immediate cause of death was undoubtedly oxygen toxicity acting on the central nervous system.

In our opinion, this is also confirmed by the results obtained for  $p_{iO_2} = 1.5$  ATA – i.e. an approximate oxygen partial pressure value to that used in the majority of the quoted studies on humans. In the case of such a  $p_{iO_2}$  value the most important factor, crucial for the development of oxygen toxicity symptoms, is the exposure time – and this particular relationship is easily observable in the presented own studies in the case of extending hyperbaric exposure to 4 hours. After an initial growth of the effective lumen of the respiratory tract with exposure time of 2 hours, most certainly caused by the activation of typical antioxidant defence mechanisms due to an increasing oxidative stress in the experimental animals, the lumen section of blood vessels shrinks (a commonly known phenomenon), in the face of 'overcoming' an organism's defence mechanisms, including the widening of the lumen of blood vessels dependent of NO [8] resulting in a plethora and swelling, the effective lumen of this level of the respiratory tract becomes reduced.

Although for the purpose of this publication no detailed analysis of qualitative histological changes observed in the trachea wall of examined rats was conducted with regard to duration time prolongation, the results of evaluation of microscopic images seem to correspond to the results published in recognized works on treating (micro)structural changes of the respiratory system in the course of pulmonary oxygen toxicity [13, 14, 15, 16].

A separate topic for consideration is the question of how the results obtained by other researcher carried out on humans may be related to observations carried out on an animal model, and vice versa. Some of the data available in the literature indicate that in the case of research connected with pulmonary oxygen toxicity, especially with long exposure times, using rats does not constitute an ideal research model, particularly in the aspect of 1:1 result transition onto the human population.

Po przemijającym wzroście efektywnego światła dróg oddechowych przy czasie 2 h, najpewniej spowodowanym uaktywnieniem się u zwierząt doświadczalnych typowych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w związku z narastającym w ich organizmach stresem oksydacyjnym, skutkujących ograniczeniem przekroju światła naczyń krwionośnych (co jest zjawiskiem powszechnie znanym), wobec „przełamania” mechanizmów obronnych organizmu, w tym zależnego od NO poszerzenia światła naczyń krwionośnych [8] skutkującego przekrwieniem i obrzękiem, dochodzi do następczego zmniejszenia efektywnego światła tego piętra dróg oddechowych.

Choć nie analizowano szczegółowo na potrzeby niniejszej publikacji jakościowych zmian histologicznych obserwowanych w zakresie ściany tchawicy badanych szczurów w miarę wydłużania czasu ekspozycji, wyniki oceny obrazów mikroskopowych wydają się w pełni odpowiadać wynikom opublikowanym w uznanych pracach traktujących o zmianach (mikro)strukturalnych układu oddechowego w przebiegu tlenowej toksyczności płucnej [13,14,15,16].

Osobnym tematem do rozważań jest, na ile wyniki uzyskane przez innych badaczy u ludzi można odnosić do obserwacji na modelu zwierzęcym i odwrotnie. Niektóre dane z piśmiennictwa wskazują, iż akurat w przypadku badań związanych z tlenową toksycznością płucną, zwłaszcza przy długich czasach ekspozycji, wykorzystanie szczurów nie stanowi idealnego modelu badawczego, szczególnie w aspekcie przenoszenia 1:1 uzyskanych wyników badań na populację ludzką. Według Harabin i wsp. spodziewany czas przeżycia drobnych ssaków w atmosferze czystego tlenu pod ciśnieniem 1 ATA wynosi około 3 dni, podczas gdy naczelnie i człowiek są w stanie przeżyć w takich warunkach przez 7 do 14 dni [11].

## WNIOSKI

- Obserwowane w zastosowanym modelu zwierzęcym zjawisko zmniejszenia efektywnego światła środkowego piętra dróg oddechowych pozostaje w bezpośrednim związku z narastającymi w funkcji czasu i oddziałującego ciśnienia cząstkowego tlenu morfologicznymi wykładnikami zatrucia tlenowego, dotyczącymi ściany tchawicy i dużych oskrzeli.
- Podobne zjawisko może być przyczyną obserwowanych u ludzi podczas tlenowych ekspozycji hiperbarycznych objawów klinicznych, związanych z toksycznością tlenową w stosunku do układu oddechowego.
- Wyniki prowadzonych na szczurach badań doświadczalnych toksyczności tlenowej dla środkowego piętra dróg oddechowych, podobnie jak tlenowej toksyczności płucnej, powinny być odnoszone do ludzi z dużą ostrożnością.

According to Harabin and others the expected survival time of small mammals in a pure oxygen atmosphere under the pressure of 1 ATA is approximately equal to 3 days, whereas primates and humans are capable of surviving in such conditions for 7 to 14 days [11].

### **CONCLUSIONS**

- The observed reduction of the effective lumen of the middle part of the respiratory tract in the applied animal model is directly related to the intensification of morphological exponents of oxygen toxicity in the trachea wall and large bronchi, in the conditions of a prolonged exposure time and increasing oxygen partial pressure.
- A similar phenomenon may be the reason for the occurrence of clinical symptoms of oxygen toxicity related to the respiratory system observable in humans during hyperbaric oxygen exposures.
- The results of the experiments on oxygen toxicity of the middle part of the respiratory tract conducted on rats, similarly as the results concerned with pulmonary oxygen toxicity, must be referred to humans with great caution.

## BIBLIOGRAPHY

- 1) Allen BW, Demchenko IT, Piantadosi CA: Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. *J Appl Physiol* 2009; 106: 662-667 – doi: 10.1152/jappphysiol.91109.2008. Epub 2008 Oct 9, (in English),
- 2) Caldwell PR, Lee WL, Jr, Schildkraut HS, Archibald ER: Changes in lung volume, diffusing capacity, and blood gases in men breathing oxygen. *J Appl Physiol* 1966; 21(5): 1477-1483, (in English),
- 3) Clark JM, Lambertsen CJ: Pulmonary oxygen toxicity: a review. *Pharm Rev* 1971; 23: 37-133, (in English),
- 4) Clark JM: Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. *Exp Lung Res* 1988; 14: 897-910, (in English),
- 5) Clark JM, Gelfand R, Flores ND, Lambertsen CJ, Pisarello JB: Pulmonary tolerance in man to continuous oxygen exposure at 3.0, 2.5, 2.0 and 1.5 ATA in Predictive Studies V. W: AA Bove, AJ Bachrach i LJ Greenbaum (Eds.) *Proc Ninth International Symp Underwater and Hyperbaric Physiology*. Undersea and Hyperbaric Medical Society, Bethesda 1987: 737-749, (in English),
- 6) Clark JM, Jackson RM, Lambertsen CJ, Gelfand R, Hiller WDB, Unger M: Pulmonary function in men after oxygen breathing at 3.0 ATA for 3.5 h. *J Appl Physiol* 1991; 71: 878-885, (in English),
- 7) Curley GF, Ansari B, Hayes M, Devaney J, Masterson C, Ryan A, Barry F, O'Brien T, Toole DO, Laffey JG.: Effects of intratracheal mesenchymal stromal cell therapy during recovery and resolution after ventilator-induced lung injury. *Anesthesiology* 2013; 118 (4): 924-32 – doi: 10.1097/ALN.0b013e318287ba08, (in English),
- 8) Demchenko IT, Welty-Wolf KE, Allen BW, Piantadosi CA: Similar but not the same: normobaric and hyperbaric pulmonary oxygen toxicity, the role of nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L229-L238 (in English),
- 9) Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426, (in English),
- 10) Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO: Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism is common. *Science* 1954; 119: 623-626 (in English),
- 11) Harabin AL, Homer LD, Weathersby PK, Flynn ET: Predicting pulmonary O<sub>2</sub> toxicity: a new look at the unit pulmonary toxicity dose. *Report NMRI 86-52*. Naval Medical Research Institute, Bethesda 1986, (in English),
- 12) Jamieson D: Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Rad Biol Med* 1989; 7: 87-108, (in English),
- 13) Kapanci Y, Weibel ER, Kaplan HP, Robinson FR: Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab Invest* 1969; 20(1): 101-118, (in English),
- 14) Kapanci Y, Tosco R, Eggermann J, Gould VE: Oxygen pneumonitis in man: light and electron microscopic morphometric studies. *Chest* 1972; 62: 162-169, (in English),
- 15) Kaplan HP, Robinson FR, Kapanci Y, Weibel ER: Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. I. Clinical and light microscopic studies. *Lab Invest* 1969; 20(1): 94-100, (in English),
- 16) Kistler GS, Caldwell PRB, Weibel ER: Development of fine structural damage to alveolar and capillary lining cells in oxygen-poisoned rat lungs. *J Cell Biol* 1967; 33: 605-628, (in English),
- 17) Lambertsen CJ: Effects of hyperoxia on organs and their tissues. W: C Lenfant (Ed.) *Lung biology in health and disease*. Vol. 8: ED Robin (Ed.) Extrapulmonary manifestations of respiratory disease. Marcel Dekker, New York 1978: 239-303, (in English),
- 18) Shykoff B: Pulmonary effects of submerged breathing of air or oxygen. *NEDU TR 02-14*. Navy Experimental Diving Unit, Panama City 2002, (in English),

- 19) Shykoff BE: Pulmonary effects of submerged oxygen breathing: 4-, 6-, and 8-hour dives at 140 kPa. *Undersea Hyperb Med* 2005; 32 (5): 351-361, (in English),
- 20) Shykoff B: Pulmonary effects of six-hour dives: in-water or dry chamber exposure to an oxygen partial pressure of 1.6 ATM. *NEDU TR 05-19*. Navy Experimental Diving Unit, Panama City 2005, (in English),
- 21) Shykoff BE: Pulmonary effects of submerged oxygen breathing in resting divers: repeated exposures to 140 kPa. *Undersea Hyperb Med* 2008; 35 (2): 131-143, (in English),
- 22) Shykoff BE: Pulmonary effects of submerged exercise while breathing 140 kPa oxygen. *Undersea Hyperb Med* 2008; 35 (6): 417-426, (in English),
- 23) Smith JL: The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J Physiol* 1899; 24 (1): 19-35, (in English).

## **ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В СТЕНКЕ ТРАХЕИ КРЫС ПРИ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ**

*Клинические наблюдения и экспериментальные результаты показали токсическое воздействие кислорода как в нормобарии так и в гипербарии. Большинство предыдущих исследований имело дело с изменениями в легочной ткани, только некоторые относятся к воздействию гипербарической оксигенации на дыхательную систему. Целью этих исследований на животных моделях являлась оценка эффективности давления вдыхаемого кислорода (гипербарической оксигенации) и продолжительность этого давления на морфологические изменения в слизистой и подслизистой оболочке трахеи.*

*Гипербарическая оксигенация соответствующая глубине 5 - 7 метров вызывает у крыс переходную, продолжительностью от 3 до 20 минут, физическую активность и повышение агрессивности.*

*Дальнейшее увеличение давления кислорода приводит к снижению подвижности крыс и на глубине 40 м ведет к экстремальному ослаблению дыхания и падению животных.*

*Повышение гипербарической оксигенации приводит у крыс к утолщению слизистой и подслизистой оболочки при одновременном сужению просвета трахеи. Эти изменения увеличиваются с продлением продолжительности действия гипербарической оксигенации.*

*Наиболее выраженные морфологические изменения были обнаружены в подслизистой оболочке трахеи. Среди этих изменений был интерстициальный отек с расширением сосудистого русла.*

*Во время увеличения гипербарической оксигенации наблюдалось утолщение слизистой и подслизистой оболочки, при одновременном снижении просвета трахеи. С увеличением времени действия гипербарической оксигенации аналогичные тенденции сохранились.*

**Ключевые слова:** кислород, гипербария, морфометрия, трахея

**dr med. Piotr Siermontowski**  
Zakład Medycyny Morskiej  
i Hiperbarycznej  
Wojskowy Instytut Medyczny  
ul. Grudzińskiego 4 81-103 Gdynia 3  
skr. poczt. 18  
e-mail: nurdok@tlen.pl

**dr med. Maciej Konarski**  
Zakład Medycyny Morskiej i  
Hiperbarycznej,  
Wojskowy Instytut Medyczny  
ul. Grudzińskiego 4  
81-103 Gdynia 3  
e-mail: mkonarski@op.pl

**dr hab. med. Agnieszka Pedrycz**  
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii  
z Pracownią Cytologii Doświadczalnej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
ul. Radziwiłłowska 11 20-080, Lublin  
e-mail: apw4@wp.pl

**lek. med. Tomasz Wojtowicz**  
Zakład Medycyny Morskiej  
i Hiperbarycznej,  
Wojskowy Instytut Medyczny  
ul. Grudzińskiego 4 81-103 Gdynia 3  
skr. poczt. 18  
e-mail: rapifen@o2.pl

**dr n. med. Katarzyna Ostapowicz  
van Damme**  
Zakład Zintegrowanej Opieki Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Marii Skłodowskiej – Curie 7A  
15-096 Białystok, tel. 85 748 55 28

**lek. med. Maciej Kulig**  
Klinika Chorób Wewnętrznych  
i Reumatologii  
Wojskowy Instytut Medyczny, Centralny  
Szpital Kliniczny MON  
ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa