

# Морфологическая характеристика эпителия слизистой оболочки бронхиального дерева при стрептозотоциновом диабете

<sup>1</sup>Пивоварова О.А., <sup>2</sup>Маньковский Б.Н.

<sup>1</sup>ГУ Луганский государственный медицинский университет, Луганск  
(ректор — д.м.н, проф. В.К. Ивченко)

<sup>2</sup>Национальная медицинская академия последиplomного образования им. П.Л. Шупика, Киев  
(ректор — д.м.н., акад. НАМН Ю.В. Вороненко)

**Цель.** Изучить состояние эпителиального пласта бронхиального дерева на модели экспериментального сахарного диабета.  
**Материалы и методы.** Объектом исследования были 47 белых крыс линии Wistar с массой  $234,00 \pm 2,64$  г, в возрасте 5–6 месяцев. Контрольную группу составляли 43 интактных белых крыс (самцы) линии Wistar с массой тела  $242,00 \pm 2,13$  г в возрасте 5–6 месяцев.

Модель стрептозотоцинового диабета воспроизводили однократным интраперитонеальным введением стрептозотоцина (SIGMA, США) в 0,1 М цитратном буфере, pH 4,5, крысам Wistar в дозе 60 мг/кг.

**Результаты.** Было зафиксировано статистически достоверное уменьшение общей площади эпителиального пласта в группе крыс с сахарным диабетом на 25,9%, которое сопровождалось уменьшением надъядерной зоны на 22,1% при сравнении с показателями в контрольной группе.

**Заключение.** Установлено развитие атрофических изменений слизистой оболочки бронхов в группе крыс с экспериментальным диабетом, а также снижение физических защитных факторов в виде уменьшения продукции слизи секреторными клетками бронхиальной выстилки.

**Ключевые слова:** стрептозотоциновый диабет; бронхиальное дерево; морфометрия

## Morphology of bronchial epithelium in rodent streptozotocin-induced diabetes mellitus

Pivovarova O.A.<sup>1</sup>, Mankovsky B.N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

<sup>2</sup>P.L.Shupik National Medical Academy of Postgraduate Education, Kiev, Ukraine

**Aim.** To study the morphology of bronchial epithelium in a rodent streptozotocin-induced (STZ) diabetes mellitus.

**Materials and Methods.** Diabetes mellitus was introduced in 47 white Wistar rats aged 5–6 months (body weight  $234.0 \pm 2.64$  g). 43 white Wistar rats of the same age were used as control subjects (body weight  $242.0 \pm 2.13$ ). Diabetes was induced by single intraperitoneal injection of STZ (SIGMA, USA) 60 mg/kg in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5.

**Results.** A statistically significant decrease in the total epithelial area by 25.9% was observed in the study group, accompanied by a reduction of the supranuclear zone by 22.1% vs. the control group.

**Conclusion.** We found that bronchial mucous membrane in rodents with STZ-induced diabetes mellitus exhibits signs of atrophy and partial loss of mucous production by bronchial secretory cells.

**Keywords:** streptozotocin-induced diabetes; bronchi; morphology

DOI: 10.14341/DM2013444-48

На основании многочисленных исследований установлено, что ведущая роль в развитии хронического повреждения воздухоносных путей, наряду с нарушениями иммунологической реактивности [1, 2, 3], принадлежит мукоцилиарной недостаточности [4, 5] и характеризуется изменениями в бронхиальном дереве [6, 7, 8], которые сопровождаются нарушением секреторной функции бронхов. При этом закономерно происходят морфофункциональные нарушения, в первую очередь, в эпителиальном слое бронхиального дерева [9]. В работах многих авторов указывается, что в условиях хронического воспаления

в эпителии наблюдаются нарушения регенераторной способности [10], пролиферации и дифференцировки клеток [11, 12], что играет важную роль в повреждении мукоцилиарного клиренса и, как следствие, — в нарушении защитной функции дыхательной системы [13].

Несмотря на многочисленные исследования органов дыхания у пациентов при сахарном диабете [14, 15], полученные данные противоречивы. В доступной нам литературе не было обнаружено детального морфометрического исследования эпителиальной выстилки нижних воздухоносных путей при сахарном диабете.

Таблица 1

Характеристика гистологических изменений эпителиального пласта нижних воздухоносных путей у крыс при стрептозотоциновом диабете и в контрольной группе

| Гистологические изменения ЭП нижних воздухоносных путей | Группы крыс |                           |
|---------------------------------------------------------|-------------|---------------------------|
|                                                         | ЭСД (n=47)  | Контрольная группа (n=43) |
| Утолщение ресничек, n (%)                               | 15 (31,9)*  | 3 (6,9)                   |
| Уменьшение количества ресничек, n (%)                   | 24 (51,06)* | 8 (18,6)                  |
| Неравномерность распределения ресничек, n (%)           | 12 (25,5)   | 12 (27,9)                 |
| Утрата ресничек (облысение), n (%)                      | 9 (19,1)*   | -                         |
| Уменьшение высоты ресничек, n (%)                       | 21 (44,7)*  | 5 (11,6)                  |
| Атрофия ресничек, n (%)                                 | 17 (36,2)*  | -                         |
| Усиление многорядности, n (%)                           | 8 (17,02)*  | 1 (2,3)                   |

Примечание. \* –  $p < 0,05$  статистически достоверное отличие между изменениями ЭП нижних воздухоносных путей у крыс с ЭСД по сравнению с крысами контрольной группы.

Поэтому целью данной работы было изучение возможных морфологических изменений эпителиального пласта (ЭП) бронхиального дерева на модели стрептозотоцинового диабета.

## Материалы и методы

С целью изучения гистологических изменений ЭП бронхиального дерева было исследовано 90 белых крыс (самцов) линии Wistar в возрасте 5–6 месяцев. Модель экспериментального сахарного диабета (ЭСД) воспроизводили на 47 особях с исходной массой тела  $234,00 \pm 2,64$  г путем однократного интраперитонеального введения стрептозотцина (SIGMA, США) в 0,1 М цитратном буфере pH 4,5, в дозе 60 мг/кг. Введение стрептозотцина осуществляли после предварительной 24-часовой депривации пищи при сохраненном доступе к воде. С целью формирования полного и стабильного диабета животных содержали на протяжении 11 суток на стандартной диете.

Контрольную группу для гистологического исследования составляли 43 интактных белых крысы с массой тела  $242,00 \pm 2,13$  г.

Определение глюкозы крови из хвостовой вены проводили глюкозооксидазным методом. Для дальнейшего исследования использовали только особей с повышенным уровнем глюкозы ( $>11$  ммоль/л).

Выводили крыс из эксперимента методом декапитации.

Для гистологического исследования использовали материал, зафиксированный в 10% нейтральном формалине. Согласно стандартным методикам изготавливали парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином. Обработку материала проводили на свето-оптическом микроскопе Olympus (Japan) BX-41 с использованием программного обеспечения для анализа видеоизображения – Quick Photo Micro 2.3 (Германия).

Работу с животными осуществляли согласно положениям «Общих этических принципов экспериментов на животных», принятых I национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласно международным требованиям «Европейской конвенции защиты позво-

ночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях».

## Результаты и их обсуждение

Согласно проведенному исследованию, структурно-функциональные альтерации ЭП дыхательных путей характеризовались статистически достоверным утолщением ресничек у 15 (31,9%) крыс с ЭСД и у 3 (6,9%) из контрольной группы, уменьшением высоты ресничек у 21 (44,7%) особи с ЭСД и у 5 (11,6%) из контрольной группы вплоть до атрофии ресничек у 17 (36,2%) крыс с ЭСД и равнозначными показателями неравномерности распределения ресничек на слизистой в обеих группах крыс (табл. 1).

Некоторые из гистологических трансформаций представлены на рис. 1.

При исследовании биоптатов далеко не все патологические признаки повреждения ЭП воздухоносных путей могут быть использованы для диагностики. Установлено, что на уровне долевых и сегментарных бронхов отмеча-

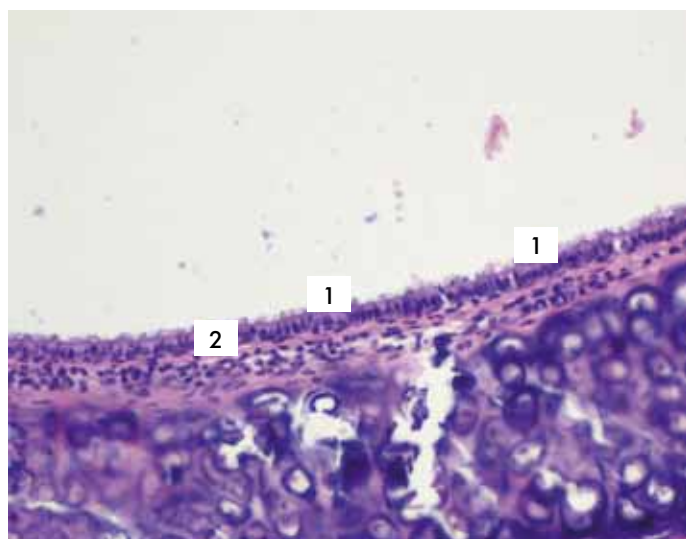


Рис. 1. Зоны «облысения» ЭП нижних воздухоносных путей (окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$ ):

1 – эпителиальная выстилка без наличия ресничек;  
2 – надъядерная зона.

Таблица 2

Т-критерий независимых выборок для общей площади ЭП воздухоносных путей в исследуемых группах

| Исследуемые значения                       | t-критерий | p        | Ст. откл. | Ст. откл. | F-отн.   | p        |
|--------------------------------------------|------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|
| ОПЭП при ЭСД vs. ОПЭП в контрольной группе | 6,540626   | 0,000000 | 282,1127  | 709,6480  | 6,327626 | 0,000000 |

Примечание. Переменные рассматриваются как независимые выборки.

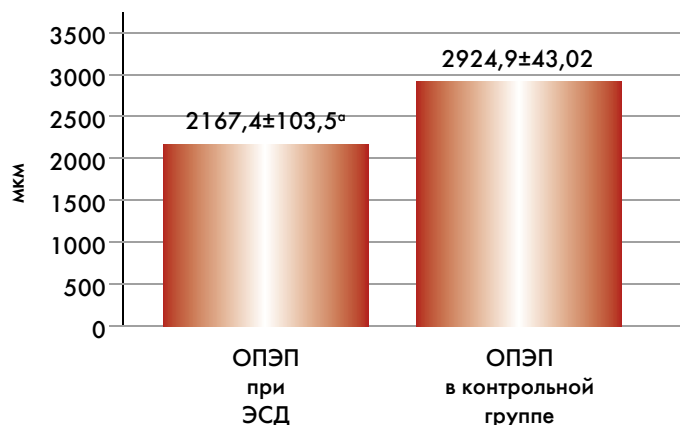


Рис. 2. Общая площадь эпителиального пласта воздухоносных путей в исследуемых группах.

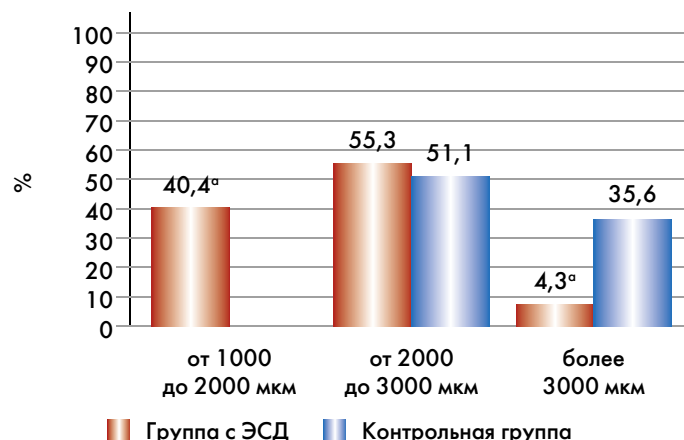
а –  $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой.

Рис. 3. Распределение и частота встречаемости (%) общей площади эпителиального пласта воздухоносных путей в исследуемых группах.

а –  $p < 0,001$  в сравнении с контрольной группой.

ется большое сходство с изменениями ОПЭП при различной хронической патологии легких.

Поэтому, при гистологическом исследовании ОПЭП рекомендуется использовать морфометрическую методику оценки эпителия слизистой оболочки бронхов.

В результате исследования было установлено, что общая площадь эпителиального пласта (ОПЭП) в группе крыс с ЭСД составляла  $2167,4 \pm 103,5$  мкм, что было ниже на 25,9% при сравнении с аналогичными показателями в контрольной группе, где данный результат составлял  $2924,9 \pm 43,02$  мкм.

Характеристика ОПЭП воздухоносных путей представлена на рис. 2.

При сравнении групп с помощью проверки статистических гипотез мы вычисляли значение  $p$  – вероятность того, что случайные выборки будут различаться в той или же большей степени (табл. 2.)

Полученные в ходе эксперимента данные всегда изучаются простейшим методом анализа категориальных (номинальных) переменных, и эти результаты представляются в виде таблицы частот или одноходовых таблиц. В ходе обработки полученных результатов, мы использовали их как одну из процедур разведочного анализа, для выяснения, каким образом различные группы данных распределены в выборке.

При этом, наибольшая ОПЭП в группе крыс с ЭСД, при критерии нормальности Колмогорова-Смирнова  $d=0,12206$ , в контрольной группе –  $d=0,13935$ ; критерии Лиллиефорса  $p < 0,10$  у крыс с ЭСД, в контрольной группе –  $p < 0,05$ ; при критерии Шапиро-Уилка  $W=0,86718$  у крыс с ЭСД и в контрольной группе –  $W=0,85914$ ; при  $p=0,00008$  в группе с ЭСД и в контрольной группе –  $p=0,00009$ , находилась в интервале от 1000 до 2000 мкм у 19 (40,4%) исследуемых с ЭСД, тогда как в контрольной

группе таких показателей ОПЭП не было установлено; в интервале от 2000 до 3000 мкм у 26 (55,3%) крыс с ЭСД в отличие от контрольной группы, где наименьшая ОПЭП была в интервале от 2400 мкм у 22 (51,1%) крыс, а в интервале более 3000 мкм лишь у 2 (4,3%) в группе с ЭСД, тогда как в контрольной группе у 21 (48,8%) крысы. Распределение и частота встречаемости ОПЭП нижних воздухоносных путей в исследуемых группах представлены на рис. 3.

Имея полученные данные ОПЭП нижних воздухоносных путей, мы можем предположить, что в группе крыс с ЭСД имеет место значительное уменьшение площади эпителиальной выстилки, что может свидетельствовать об атрофических трансформациях слизистой оболочки.

Общеизвестно, что слизистая оболочка воздухоносных путей изнутри выстлана многоядным мерцательным призматическим эпителием, в котором имеется 4 основных типа клеток: реснитчатые, бокаловидные, промежуточные и базальные. Для установления различных видоизменений бронхиальной выстилки мы рассчитывали площадь краевой каймы эпителия – формализованный признак, под которым подразумевается надъядерная часть реснитчатых и бокаловидных клеток. В результате расчетов, в группе крыс с ЭСД надъядерная зона (НЯЗ) составляла  $886,4 \pm 31,1$  мкм, что на 22,1% меньше, чем в контрольной группе, где данный показатель составлял  $1138,4 \pm 15,4$  мкм.

Морфометрическая характеристика НЯЗ в группах представлена на рис. 4.

Учитывая достоверность изучаемых признаков, было определено, в какой степени полученные результаты были справедливы в отношении изучавшейся выборки (табл. 3.).

Учитывая статистические законы распределения для переменных, при критерии нормальности Колмогорова-Смир-

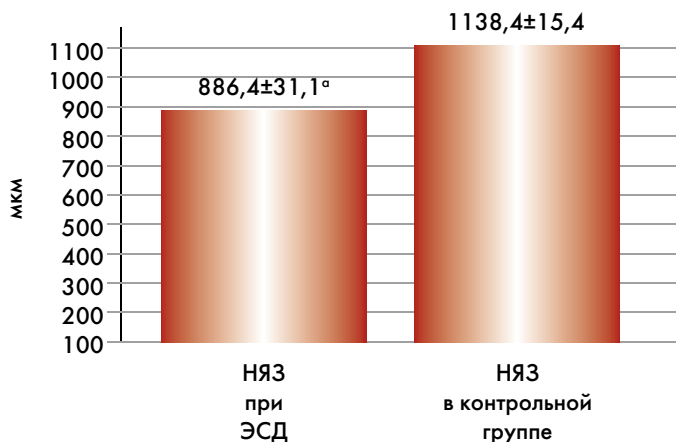


Рис. 4. Абсолютный показатель НЯЗ реснитчатых и бокаловидных клеток воздухоносных путей в исследуемых группах.

а –  $p < 0,001$  в сравнении с контрольной группой.

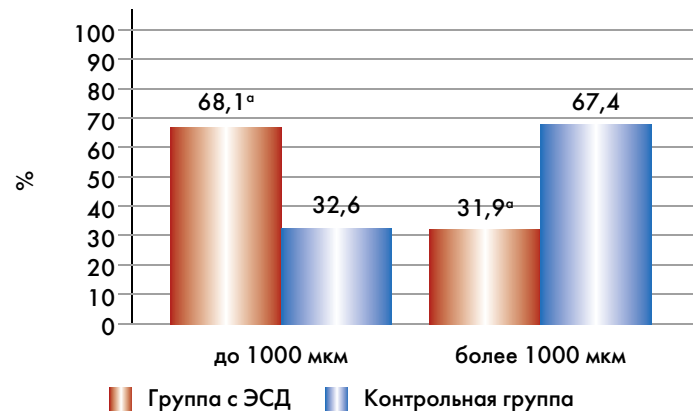


Рис. 5. Распределение и частота встречаемости (%) абсолютного показателя надъядерной зоны реснитчатых и бокаловидных клеток воздухоносных путей в исследуемых группах.

а –  $p < 0,01$  в сравнении с контрольной группой.

Таблица 3

| Т-критерий независимых выборок для абсолютного показателя надъядерной зоны реснитчатых и бокаловидных клеток воздухоносных путей в исследуемых группах |            |          |           |           |          |          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Исследуемые значения                                                                                                                                   | t-критерий | p        | Ст. откл. | Ст. откл. | F-отн.   | p        |
| НЯЗ при ЭСД vs. НЯЗ в контрольной группе                                                                                                               | 7,05221    | 0,000000 | 213,4544  | 100,7592  | 4,487872 | 0,000003 |

Примечание. Переменные рассматриваются как независимые выборки.

нова в группе исследуемых с ЭСД  $d=0,09240$ , а в контрольной группе –  $d=0,19249$ ; критерии Лиллиефорса в группе с ЭСД  $p > 0,20$ , а в контрольной группе –  $p < 0,01$ ; при критерии Шапиро-Уилка  $W=0,97991$  у крыс с ЭСД и  $W=0,87614$  в контрольной группе; при  $p=0,58871$  у крыс с ЭСД и  $p=0,00026$  в контрольной группе было установлено, что у крыс с ЭСД наибольшая частота встречаемости значения НЯЗ реснитчатых и бокаловидных клеток воздухоносных путей находилась в пределах до 1000 мкм у 32 (68,1%) особей, тогда как в контрольной группе всего лишь у 14 (32,6%) крыс. Следует отметить, что частота встречаемости значения НЯЗ в пределах более 1000 мкм наблюдалась у 15 (31,9%) крыс, но не выходила за пределы 1400 мкм, тогда как в контрольной группе – у 29 (67,4%) исследуемых. Распределение и частота встречаемости значения НЯЗ нижних воздухоносных путей в исследуемых группах представлены на рис. 5.

## Выводы

Таким образом, в результате изучения морфологических и морфометрических параметров эпителия слизистой оболочки бронхов мы установили нарушение структурного барьера слизистой нижних воздухоносных путей в виде уменьшения ОПЭП, что свидетельствует о преобладании атрофических преобразований в группе крыс с ЭСД. Кроме этого, в группе крыс с ЭСД нами было диагностировано уменьшение НЯЗ ЭП, что предполагает снижение физических защитных факторов в виде уменьшения секреции слизи секреторными клетками бронхиальной выстилки.

Авторы декларируют отсутствие конфликта (двойственности) интересов в связи с написанием данной статьи.

## Список литературы

- Vila-Corcoles A, Ochoa-Gondar O. Pneumococcal vaccination among adults with chronic respiratory diseases: a historical overview. Expert Review of Vaccines. 2012;11(2):221–236. DOI: 10.1586/erv.11.176
- Kheradmand F, Shan M, Xu C, Corry DB. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: clinical and experimental evidence. Expert Review of Clinical Immunology. 2012;8(3):285–292. DOI: 10.1586/eci.12.7
- Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF-alpha in pulmonary pathophysiology. Respiratory research. 2006;7:125–130.
- Parker C, Thavagnanam ST, Skibinski G, Heaney LG, Shields MD. Mechanisms of lung infection in the community and hospital setting: S86 effects of exposure to IL-13, IL-31 and an IL-13/31 combination on mucociliary differentiation of bronchial epithelial cells. Thorax. 2010;65(Suppl 4):A40. DOI: 10.1136/thx.2010.150938.37
- Pasteur MC, Bilton D, Hill AT. British thoracic society guideline for non-CF bronchiectasis. Thorax. 2010;65(Suppl 1):i1–i58. DOI: 10.1136/thx.2010.136119
- Lee P, Khoo KL. A review of current bronchoscopic interventions for obstructive airway diseases. Therapeutic Advances in Respiratory Disease. 2012;6(5):297–307. DOI: 10.1177/1753465812455448
- Lommatzsch SE, Martin RJ. Importance of fiberoptic bronchoscopy in identifying asthma phenotypes to direct personalized therapy. Current opinion in pulmonary medicine. 2013;19(1):42–48. DOI: 10.1097/MCP.0b013e32835a5bdc

8. Mirrakhimov AE. Chronic obstructive pulmonary disease and glucose metabolism. *Cardiovascular Diabetology*. 2012;11:132. DOI: 10.1186/1475-2840-11-132
9. Clay AS, Behnia M, Brown KK. Mitochondrial disease: A pulmonary and critical-care medicine perspective. *Chest*. 2001;120(2):634–648. DOI: 10.1378/chest.120.2.634
10. Maniscalco WM, Watkins RH, O'Reilly MA, Shea CP. Increased epithelial cell proliferation in very premature baboons with chronic lung disease. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2002;283(5):L991–L1001. DOI: 10.1152/ajplung.00050.2002
11. Skjølør-Arkil H, Clausen RE, Nguyen QH, Wang Y, Zheng Q, Martinez FJ, et al. Measurement of MMP-9 and -12 degraded elastin (ELM) provides unique information on lung tissue degradation. *BMC Pulmonary Medicine*. 2012;12:34. DOI: 10.1186/1471-2466-12-34
12. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SFP, Sin DD. The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2011;5(4):255–273. DOI: 10.1177/1753465810396539
13. Ходзицкая ВК. Нарушение и коррекция мукоцилиарного клиренса при заболеваниях дыхательных путей. Болезни и антибиотики. 2010;1(3):5–12. [Khodziitskaya VK. Narushenie i korrektsiya mukotsiliarnogo klirensa pri zabolevaniyakh dykhatel'nykh putey. *Bolezni i antibiotiki*. 2010;1(3):5–12].
14. Wood AM, Stockley RA. Editorial: Unifying the genetics, co-morbidities and management of COPD. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2008;2(3):113–117. DOI: 10.1177/1753465808092282
15. Березин АЕ. Биологические прогностические факторы риска у пациентов с внебольничной пневмонией. Клиническое значение, ожидания и перспективы. *Український медичний часопис*. 2010;77(3):81–87. [Berezin AE. Biologicheskie prognosticheskie faktory riska u patsientov s vnebol'nichnoy pnevmoniey. *Klinicheskoe znachenie, ozhidaniya i perspektivy*. *Ukrain'skiy medichniy chasopis*. 2010;77(3):81–87].

**Пивоварова Оксана Анатольевна**

к.м.н., доцент кафедры внутренней медицины, ГУ Луганский государственный медицинский университет, Луганск, Украина

**E-mail:** aksiniyalosk@mail.ru

**Маньковский Борис Никитич**

д. м. н., проф., член-корр. НАМН Украины, зав. кафедрой диabetологии, Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика, Киев, Украина