

АНОТАЦІЯ

Федорченко Ю.В. Патогенетичні механізми розвитку змін у респіраторному відділі легень при експериментальному цукровому діабеті. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 – Охорона здоров'я за спеціальністю 222 – Медицина. Івано-Франківський національний медичний університет, МОЗ України, м. Івано-Франківськ, 2023.

Захист відбудеться у спеціалізованій вченій раді Івано-Франківського національного медичного університету МОЗ України, Івано-Франківськ, 2023.

На сьогодні цукровий діабет (ЦД) належить до глобальних медико-соціальних проблем і посідає одне з головних місць у структурі ендокринної патології. Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я та Міжнародної Діабетичної Федерації кількість хворих на ЦД у всьому світі зростає до 629 мільйонів до 2045 року. Гостроту проблеми визначає не лише значне поширення, але й швидкий розвиток ускладнень, які спричиняють інвалідизацію, погіршують якість життя хворих та скорочують його тривалість. Численні клінічні та експериментальні дослідження свідчать, що ЦД вражає багато органів і систем організму. Ретинопатія, нефропатія, нейропатія та серцево-судинна дисфункція є поширеними діабетичними ускладненнями та значно сприяють захворюваності. Разом з тим, з'являється все більше доказів того, що легені також є одним із органів-мішеней при ЦД, так як вони мають величезну, добре розвинену мікросудинну сітку.

Метою дослідження було встановити основні механізми розвитку функціонально-морфологічних змін у респіраторному відділі легень при експериментальному ЦД.

Експерименти виконані на 88-и білих щурах-самцях лінії Вістар масою 170-210 г. Тварини були розподілені на три групи: 1 – інтактна (n=10); 2 – контрольна (n=40); 3 – дослідна (n=38) з моделлю цукрового діабету, який відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину

фірми «Sigma» (США), розведеного в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5, з розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин внутрішньоочередово вводили еквівалентну дозу 0,1 М цитратного буферного розчину з рН 4,5.

Усі маніпуляції здійснювалися під тіопентал-натрієвим знеболенням із розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Забір матеріалу проводили через 14, 28, 42 і 70 діб після ін'єкції стрептозотоцину.

Для вивчення ендогенної інтоксикації використовували молекули середньої маси (МСМ) у сироватці крові, а для оцінки антиоксидантної системи (АОС) – рівень каталази в сироватці крові експериментальних тварин.

Оцінку стану процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) здійснювали за допомогою визначення концентрації дієнових кон'югатів (ДК) і активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) у сироватці крові піддослідних тварин.

Визначення окисної модифікації білків (ОМБ) сироватки крові вивчали методом спектрофотометричного аналізу карбонільних груп із використанням 2,4-динітрофенолгідразину, оптичну щільність яких реєстрували на спектрофотометрі при довжинах хвиль: 356 нм, 370 нм, 430 нм і 530 нм.

Вміст сурфактантних протеїнів (SP)-A1, SP-B та інтерлейкінів (IL)-1 β , IL-6, фактору некрозу пухлин- α (TNF- α) у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням наборів Rat ELISA Kits (Elabscience, США) згідно інструкції фірми-виробника.

Для електронномікроскопічного дослідження шматочки легеневої тканини фіксували в 2,5 % розчині глютаральдегіду з наступною дофіксацією в 1 % розчині чотириокису осмію. Після дегідратації матеріал заливали в епон-аралдіт. Зрізи, отримані на ультрамікротомі «Tesla BS-490», вивчали в електронному мікроскопі «ПЕМ-125К».

При проведенні статистичної обробки отриманих результатів була використана програма STATISTICA 10.

Проведені біохімічні та імуноферментні дослідження показали, що через 14 діб після моделювання ЦД в сироватці крові спостерігається підвищення рівня глюкози на 222,5%, інтенсифікація процесів ліпопероксидації (підвищення вмісту ДК на 31,8%, ТБК-АП на 36,2%), збільшення концентрації каталази на 46,6%, МСМ₂₅₄ на 32,9%, МСМ₂₈₀ на 12,7%, зростання вмісту ОМБ_{356нм} на 27,1%, ОМБ_{370нм} на 18,6%, ОМБ_{430нм} на 66,9%, ОМБ_{530нм} на 73,6% у порівнянні з контрольними групами тварин. Рівень SP-A1 у сироватці крові перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин на 7,9%, а рівень SP-B – на 8,5%. Відмічається збільшення у сироватці крові вмісту TNF- α на 11,8%, IL-1 β на 22,5%, IL-6 на 17,5% відносно показників контрольних груп тварин.

Через 28 діб після початку експерименту в сироватці крові визначається підвищення вмісту глюкози на 224,4%, ДК на 104,4%, ТБК-АП на 55,5%, зростання рівня каталази на 74,8%, МСМ₂₅₄ на 51,7%, МСМ₂₈₀ на 34,0%, збільшення концентрації ОМБ_{356нм} на 57,1%, ОМБ_{370нм} на 48,0%, ОМБ_{430нм} на 92,4%, ОМБ_{530нм} на 124,5% порівняно з показниками контрольних груп тварин. Вміст SP-A1 у сироватці крові зріс на 49,0%, а рівень SP-B - на 37,0% порівняно з тваринами контрольних груп. Спостерігається підвищення у сироватці крові вмісту TNF- α на 34,4%, IL-1 β на 40,2%, IL-6 на 33,2% відносно показників груп контролю.

Через 42 доби в умовах змодельованого ЦД у сироватці крові виявляється збільшення концентрації глюкози на 267,6%, посилення ліпопероксидації (зростання рівня ДК на 112,5%, ТБК-АП на 68,4%), підвищення вмісту каталази на 29,3%, МСМ₂₅₄ на 69,3%, МСМ₂₈₀ на 64,8%, збільшення рівня ОМБ_{356нм} на 119,0%, ОМБ_{370нм} на 117,3%, ОМБ_{430нм} на 127,9%, ОМБ_{530нм} на 161,1% порівняно з показниками контрольних груп тварин. Концентрація SP-A1 у сироватці крові зросла на 69,5%, а вміст SP-B у сироватці крові підвищився на 54,2% порівняно з тваринами груп контролю. Визначається збільшення у сироватці крові рівнів

TNF- α на 59,1%, IL-1 β на 73,5%, IL-6 на 60,6% відносно показників контрольних груп тварин.

Через 70 діб після моделювання ЦД в сироватці крові відмічається підвищення концентрації глюкози на 300,2%, вмісту ДК на 125,4%, ТБК-АП на 88,0%, зменшення рівня каталази на 28,1%, збільшення вмісту МСМ₂₅₄ на 100,4%, МСМ₂₈₀ на 94,5%, зростання рівня ОМБ_{356нм} на 132,0%, ОМБ_{370нм} на 124,4%, ОМБ_{430нм} на 168,7%, ОМБ_{530нм} на 207,7% порівняно з показниками груп контролю. Вміст SP-A1 у сироватці крові перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин на 91,6%, а концентрація SP-B у сироватці крові зросла на 74,5% порівняно з тваринами контрольних груп. Виявляється збільшення у сироватці крові рівня TNF- α на 80,1%, IL-1 β на 107,7%, IL-6 на 94,9% у порівнянні з показниками груп контролю.

Проведений ультраструктурний аналіз респіраторного відділу легень показав, що через 14 діб після початку експерименту значна кількість альвеолярних макрофагів (АМ) знаходиться в стані підвищеної функціональної активності. В альвеолоцитах I типу (А-I) та альвеолоцитах II типу (А-II) мітохондрії з матриксом середньої електронно-оптичної щільності. Цистерни і каналці апарату Гольджі (АГ) і гранулярної ендоплазматичної сітки (ГЕС) без особливих структурних змін. Пластинчасті тільця (ПТ) різного ступеня зрілості, величини і форми. У цитоплазмі ендотеліоцитів гемокапілярів виявляються окремі мітохондрії з просвітленим матриксом. Складові компоненти АГ і ГЕС дещо розширені. У просвіті окремих гемокапілярів альвеолярної стінки спостерігається підвищена кількість нейтрофілів та їх адгезія.

Через 28 діб дослідження у цитоплазмі А-I зустрічаються набряклі мітохондрії з поодинокими кристами. АГ представлений розширеними цистернами. Канальці ГЕС дещо розширені. В окремих А-II визначаються ПТ з наявністю нерівномірних світлих проміжків між осміофільними пластинами. В ендотеліоцитах відмічаються мітохондрії збільшені в об'ємі і поодинокими редукованими кристами. АГ складається з розширених цистерн, дрібних

пухирців і вакуоль. Канальці ГЕС з нерівними контурами і зменшеною кількістю рибосом на їх зовнішній мембрані. Базальні мембрани епітеліальних та ендотеліальних клітин локально потовщені. У просвіті гемокапілярів спостерігається підвищена кількість лейкоцитів, їх адгезія та агрегація. На даний період дослідження (28 діб) АМ характеризуються морфофункціональною неоднорідністю. В одних АМ визначаються ознаки вираженої секреторної активності, в інших спостерігається активний фагоцитоз. Поряд з цим виявляються АМ із незначною кількістю лізосом та окремих великих фагосом. Вміст фагосом неоднорідний з різною електронно-оптичною щільністю.

Через 42 доби від початку моделювання ЦД ядра А-I, А-II з нуклеоплазмою низької електронно-оптичної щільності і маргінальною локалізацією хроматину. Мітохондрії набряклі з поодинокими дезорганізованими кристами. Цистерни АГ везикулярно розширені. Канальці ГЕС різко розширені, деформовані. Поряд з цим, спостерігається фрагментація мембран ГЕС. В цитоплазмі А-II виявляються ПТ частково заповнені фосфоліпідним матеріалом і фрагментованими мембранами. Інтерстиційна тканина набрякла з підвищеною кількістю колагенових волокон. Явища гіпергідратації відмічаються і в ендотеліоцитах. Мітохондрії окремих клітин з просвітленим матриксом і майже повністю зруйнованими кристами. Поряд з розширеними цистернами ГЕС спостерігається фрагментація каналців ГЕС зі зменшеною кількістю рибосом. Базальні мембрани А-I, А-II та ендотеліоцитів на значному протязі потовщені з нечіткими контурами. У просвіті гемокапілярів відмічається адгезія та агрегація нейтрофілів і тромболойкоцитарні агрегати. У просвіті альвеол виявляються АМ з дистрофічно-деструктивними змінами.

Через 70 діб дослідження явища гіпергідратації А-I, А-II продовжують зберігатися. У багатьох клітинах визначаються деструктивні зміни клітинних органел. ПТ небагато, вони частково заповнені фосфоліпідним матеріалом. Інколи на місці ПТ відмічаються вакуолі із залишками мембран. Інтерстиційна

тканина характеризується зниженням електронно-оптичної щільності основної речовини сполучної тканини. У даних ділянках спостерігаються фібробласти з підвищеною кількістю колагенових волокон. Дистрофічно-деструктивні зміни характерні для ендотеліальних клітин. У просвіті гемокапілярів спостерігаються еритроцитарні агрегати, адгезія та агрегація лейкоцитів і тромбоцитів. Як і на попередньому етапі дослідження у просвіті альвеол виявляються АМ з дистрофічно-деструктивними змінами.

Уперше встановлено закономірності функціонально-морфологічних змін компонентів респіраторного відділу легень при експериментальному ЦД на основі комплексного підходу з використанням сучасних біохімічних, імуноферментних, електронномікроскопічних і статистичних методів дослідження. Доведено, що легенеve ушкодження у динаміці розвитку ЦД супроводжується інтенсифікацією процесів ліпідної і білкової пероксидації, ендогенної інтоксикації та активацією прозапальних цитокінів. Показано, що в умовах змодельованого ЦД про- та антиоксидантний баланс зміщується в бік переважання прооксидантних механізмів. Уперше встановлено, що підвищення концентрації в крові SP-A1 та SP-B при ЦД може служити молекулярним біомаркером ушкодження аерогематичного бар'єру легень, про що свідчать дані електронномікроскопічного дослідження.

Ключові слова: стрептозотоцин-індукований діабет, легені, респіраторний відділ, ультраструктурне дослідження, молекули середньої маси, перекисне окиснення ліпідів, окисна модифікація білків, дієнові кон'югати, ТБК-активні продукти, каталаза, сурфактантні протеїни, прозапальні цитокіни.

ANNOTATION

Fedorchenko Yu.V. Pathogenetic mechanisms of changes development in respiratory part of lungs in case of experimental diabetes mellitus. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for obtaining a degree of the Philosophy Doctor in the field of knowledge 22 – Health Care in specialty 222 – Medicine. Preparation was performed in Ivano-Frankivsk National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ivano-Frankivsk, 2023.

The defense will take place in the specialized scientific council of Ivano-Frankivsk National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ivano-Frankivsk, 2023.

Nowadays, diabetes mellitus (DM) is regarded as a global medical and social problem and occupies one of the main places in the structure of endocrine pathology. According to the data of the World Health Organization and the International Diabetes Federation, the number of people with DM will increase to 629 million by 2045 worldwide. The severity of problem is determined not only by the significant spread but also by the rapid development of complications that cause disability, worsen patients' quality of life, and shorten its duration. Numerous clinical and experimental studies show that DM affects many organs and systems of the body. Retinopathy, nephropathy, neuropathy, and cardiovascular dysfunction are common diabetic complications and significantly contribute to morbidity. However, there is increasing evidence that the lungs are also one of the target organs in DM, as they have a large, well-developed microvascular network.

The aim of the study was to establish the main mechanisms of the development of functional and morphological changes in the respiratory part of the lungs in experimental DM.

Experiments were performed on 88 white male Wistar rats weighing 170-210 grams. The animals were divided into three groups: 1 – intact (n=10); 2 – control (n=40); 3 – experimental (n=38) with a model of DM, which was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin from the company «Sigma» (USA), diluted in 0,1 M citrate buffer with pH 4,5, at the rate of 60 mg/kg of body weight. The control group of animals was intraperitoneally injected with an equivalent dose of 0,1 M citrate buffer solution with a pH of 4,5.

All manipulations were performed under sodium thiopental anaesthesia at the rate of 60 mg/kg of body weight. The material was collected 14, 28, 42 and 70 days after streptozotocin injection.

To study endogenous intoxication, we determined the level of middle mass molecules (MMM) in the blood serum and to assess the antioxidant system (AOS) - the level of catalase in the blood serum of experimental animals.

The state of the lipid peroxidation (LPO) process was assessed by determining the concentration of diene conjugates (DC) and active products of thiobarbituric acid (TBA-AP) in the blood serum of experimental animals.

Determination of oxidative modification of proteins (OMP) in blood serum was studied by spectrophotometric analysis of carbonyl groups using 2,4-dinitrophenolhydrazine, the optical density of which was recorded on a spectrophotometer at wavelengths: 356 nm, 370 nm, 430 nm, and 530 nm.

The content of surfactant protein (SP)-A1, SP-B and interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumour necrosis factor- α (TNF- α) in blood serum was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay using Rat ELISA Kits (Elabscience, USA) according to the manufacturer's instructions.

For the electron microscopy study, pieces of lung tissue were fixed in a 2,5% solution of glutaraldehyde with further postfixation in a 1% solution of osmium tetroxide. After dehydration, the material was poured over epon araldite. The cuts, obtained on ultramicrotome «Tesla BS-490», were studied using an electron microscope «PEM- 125K».

The statistical analysis of the obtained results was performed by using the software STATISTICA, version 10.

Conducted biochemical studies and enzyme-linked immunosorbent assays showed that 14 days after the simulation of DM there was an increase in the level of glucose by 222.5%, an intensification of lipoperoxidation processes (an increase in the content of DC by 31.8%, TBA-AP by 36.2%), an increase in the concentration of catalase by 46.6%, MMM₂₅₄ by 32.9%, MMM₂₈₀ by 12.7%, an increase in the

concentration of OMP_{356nm} by 27.1%, OMP_{370nm} by 18.6%, OMP_{430nm} by 66.9%, OMP_{530nm} by 73.6% in the blood serum compared to control groups of animals. The level of SP-A1 in blood serum exceeded the similar indicator of the control group of animals by 7.9%, and the level of SP-B - by 8.5%. An increase in the content of TNF- α by 11.8%, IL-1 β by 22.5%, and IL-6 by 17.5% was noted in blood serum compared to the indicators of control groups of animals.

In 28 days after the start of experiment, there was an increase in the content of glucose by 224.4%, DC by 104.4%, TBA-AP by 55.5%, an increase in the level of catalase by 74.8%, MMM₂₅₄ by 51.7%, MMM₂₈₀ by 34.0%, an increase in the concentration of OMP_{356nm} by 57.1%, OMP_{370nm} by 48.0%, OMP_{430nm} by 92.4%, OMP_{530nm} by 124.5% in the blood serum compared to the indicators of control groups of animals. The content of SP-A1 in blood serum increased by 49.0%, and the level of SP-B - by 37.0% compared to the animals of control groups. An increase in blood serum of TNF- α by 34.4%, IL-1 β by 40.2%, and IL-6 by 33.2% was found compared to the indicators of control groups of animals.

In 42 days in the conditions of simulated DM, in the blood serum an increase in the concentration of glucose by 267.6%, an increase in lipoperoxidation (an increase in the level of DC by 112.5%, TBA-AP by 68.4%), an increase in the content of catalase by 29.3%, MMM₂₅₄ by 69.3%, MMM₂₈₀ by 64.8%, an increase in the level of OMP_{356nm} by 119.0%, OMP_{370nm} by 117.3%, OMP_{430nm} by 127.9%, OMP_{530nm} by 161.1% was detected in blood serum compared to the indicators of control groups of animals. The concentration of SP-A1 in the blood serum increased by 69.5%, and the content of SP-B in the blood serum increased by 54.2% compared to the animals of the control groups. An increase in serum level of TNF- α by 59.1%, IL-1 β by 73.5%, and IL-6 by 60.6% was determined compared to the indicators of control groups of animals.

In 70 days after the simulation of DM in the blood serum an increase in the concentration of glucose by 300.2%, DC by 125.4%, TBA-AP by 88.0%, a decrease in the level of catalase by 28.1%, an increase in the content of MMM₂₅₄ by 100.4%,

MMM₂₈₀ by 94.5%, an increase in the level of OMP_{356nm} by 132.0%, OMP_{370nm} by 124.4%, OMP_{430nm} by 168.7%, OMP_{530nm} by 207.7% was noted compared to the indicators of control groups. The level of SP-A1 in the blood serum exceeded the similar value of the control group of animals by 91.6%, and the concentration of SP-B in the blood serum increased by 74.5% compared to the animals of the control groups. There was an increase in blood serum of TNF- α by 80.1%, IL-1 β by 107.7%, and IL-6 by 94.9% compared to the indicators of control groups.

The conducted ultrastructural analysis of the respiratory part of the lungs showed that 14 days after the start of the experiment, a significant number of alveolar macrophages (AM) were in a state of increased functional activity. In alveolocytes of type I (A-I) and alveolocytes of type II (A-II) mitochondria were with a matrix of medium electron-optical density. Cisterns and tubules of the Golgi apparatus (GA) and rough endoplasmic reticulum (RER) were without special structural changes. Lamellar bodies (LB) were of various degrees of maturity, size, and shape. Distinct mitochondria with lighted matrix were found in the cytoplasm of endotheliocytes of hemocapillaries. The constituent components of GA and RER were slightly expanded. An increased number of neutrophils and their adhesion were observed in the lumen of individual hemocapillaries of the alveolar wall.

In 28 days of research swollen mitochondria with single cristae were found in the cytoplasm of A-I. The GA was represented by expanded cisterns. RER tubules were slightly expanded. LBs with uneven light spaces between osmiophilic plates were noted in distinct A-II. Mitochondria increased in volume and with single reduced cristae were determined in endotheliocytes. GA consisted of expanded cisterns, small vesicles, and vacuoles. Tubules of RER were with uneven contours and a reduced number of ribosomes on their outer membrane. Basal membranes of epithelial and endothelial cells were locally thickened. An increased number of white blood cells, their adhesion and aggregation were observed in the lumen of hemocapillaries. For that research period (28 days), AMs were characterized by morphofunctional heterogeneity. In some AMs there were signs of pronounced secretory activity, in

others active phagocytosis was observed. Along with that, AMs were detected with a small number of lysosomes and individual large phagosomes. The content of phagosomes was heterogeneous with different electron-optical densities.

In 42 days from the beginning of the DM simulation, nuclei of A-I and A-II were with nucleoplasm of low electron-optical density and marginal localization of chromatin. Mitochondria were swollen with isolated disorganized cristae. Cisterns of GA were vesicularly expanded. The tubules of RER were sharply expanded and deformed. Along with that, fragmentation of membranes of RER was observed. LBs partially filled with phospholipid material and fragmented membranes were found in the cytoplasm of A-II. The interstitial tissue was swollen with an increased number of collagen fibers. Hyperhydration phenomena were also observed in endotheliocytes. Mitochondria of individual cells were with a lightened matrix and almost destroyed cristae. Along with the expanded RER cisterns, fragmentation of RER tubules with a reduced number of ribosomes was observed. Basal membranes of A-I, A-II, and endotheliocytes were thickened for a considerable length with indistinct contours. Adhesion and aggregation of neutrophils and thrombocyte aggregates were noted in the lumen of hemocapillaries. AMs with dystrophic-destructive changes were detected in the lumen of the alveoli.

In 70 days of research, hyperhydration phenomena of A-I and A-II continued to persist. Destructive changes in cell organelles were detected in many cells. There were a few LBs, partially filled with phospholipid material. Vacuoles with remnants of membranes were sometimes noted at the site of LBs. Interstitial tissue was characterized by a reduced electron-optical density of the main substance of the connective tissue. Fibroblasts with an increased number of collagen fibers were observed in those areas. Dystrophic-destructive changes were characteristic of endothelial cells. In the lumen of hemocapillaries, erythrocyte aggregates, adhesion and aggregation of white blood cells and platelets were observed. As at the previous stage of the study, AMs with dystrophic-destructive changes were found in the lumen of the alveoli.

For the first time, the patterns of functional and morphological changes in the components of the respiratory part of the lungs in experimental DM have been established based on a comprehensive approach using modern biochemical, enzyme-linked immunosorbent assay, electron-microscopic, and statistical research methods. It has been proven that in the dynamics of DM development, lung injury is accompanied by the intensification of the processes of lipid and protein peroxidation, endogenous intoxication, and activation of pro-inflammatory cytokines. It has been shown that in conditions of simulated DM, the pro- and antioxidant balance shifts towards the predominance of prooxidant mechanisms. For the first time, it has been established that an increase in the concentration of SP-A1 and SP-B in the blood in diabetes can serve as a molecular biomarker of damage to the aerogematic barrier of the lungs, as evidenced by the data of an electron microscopic study.

Key words: streptozotocin-induced diabetes, lungs, respiratory part, ultrastructural study, middle mass molecules, lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, diene conjugates, TBA-active products, catalase, surfactant proteins, pro-inflammatory cytokines.