

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭНДОПУЛЬМОНАЛЬНОЙ ЦИТОГРАММЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА<sup>1</sup>

Пивоварова О. А.

*Луганский государственный медицинский университет  
aksiniyalosk@mail.ru*

Патология легких занимает важное место в структуре причин заболеваемости и смертности, но установление диагноза респираторной патологии на ранних этапах часто вызывает большие затруднения [1, 2]. Учитывая неспецифичность симптомов различных дыхательных нарушений при инсулиновой недостаточности, а именно у пациентов с сахарным диабетом (СД) 1 типа, и завуалированность этих симптомов тяжелой фоновой патологией, необходим поиск новых информативных диагностических тестов, позволяющих выявить дыхательные расстройства на их начальном этапе развития [3–5].

Использование фибробронхоскопов, которые вошли в клиническую практику с конца 60-х годов, свело к минимуму возможные осложнения бронхоскопии и сделало бронхоальвеолярный лаваж доступным методом прижизненного получения клеток, белков, липидов и других компонентов от пациентов с различной патологией органов дыхания [6]. В то же время, среди широкого круга лабораторных исследований всё большее внимание стало уделяться исследованию цитологического состава содержимого нижних дыхательных путей [7–9].

Установлено, что исследование цитологического состава жидкости бронхоальвеолярного секрета (БАС) для диагностики патологии дыхательных путей и альвеол наиболее ценно и по своей информативности приближается к гистологическому исследованию [10]. Значительный интерес представляет изучение изменений жизнеспособности клеток бронхоальвеолярного пространства, их функциональной активности и соотношений между отдельными клеточными элементами БАС.

Изучая клеточный состав можно определить как патогенетический вариант, так и выраженность воспалительной реакции слизистой дыхательных путей [11]. Таким образом, эндопульмональная цитограмма (ЭПЦ) может служить отражением ранних этапов патологического процесса, развивающегося в дыхательной системе, и являться дополнительным неинвазивным экспресс-методом в пульмонологии [12, 13].

Цель исследования, результаты которого представлены в данной статье — на основании изучения клеточного состава жидкости бронхоальвеолярного секрета оценить возможности использования показателей эндопульмональной цитограммы для обосно-

<sup>1</sup>Работа выполнена в рамках инициативной научно-исследовательской работы кафедры внутренней медицины с профпатологией «Захворювання органів дихання з ураженням шлунково-кишкового тракту. Коморбідна патологія» (номер гос. регистрации 0111U001080). Источник финансирования — личный.

вания критериев диагностики дыхательных расстройств и выявления нарушений защит-

ной функции респираторной системы у пациентов с сахарным диабетом 1 типа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В условиях эндокринологического отделения Областной клинической больницы г. Луганска было обследовано 49 пациентов с СД 1 типа в возрасте  $54,2 \pm 1,3$  года и 47 практически здоровых лиц в возрасте  $47,8 \pm 3,5$  года. Длительность заболевания СД 1 типа составляла  $13,2 \pm 0,45$  лет. Больные с СД, а также лица контрольной группы не курили и не имели в анамнезе заболеваний бронхо-легочной системы.

Субстратом для изучения клеточных факторов бронхов являлся БАС, который получали в ходе диагностической бронхоскопии по стандартной методике [14] с использованием бронхофиброскопа ТХ-20 («Olympus», Япония). Жизнеспособность клеточных элементов оценивалась при помощи теста на исключение трипанового синего [15]. Для проведения теста в лунку панели для микротитрования вносили 0,01 мл клеточной взвеси и 0,01 мл 0,2% раствора трипанового синего. Клетки ресуспендировали пипетированием и вводили одну каплю полученной взвеси в гемоцитометрическую камеру Горяева, где подсчитывали количество голубых (погибших) и неокрашенных (живых) клеток.

Исследованию функциональной активности клеток бронхоальвеолярного пространства предшествовало разделение клеток по адгезивности [16]. Для выделения альвеолярных макрофагов, клеточную взвесь помещали в полистироловый флакон, доводили объем до 5 мл раствором Хенкса и инкубировали 1 час при  $37^\circ\text{C}$ . Затем отсасывали не прилипшие клетки, ополаскивая чашку фосфатным буферным раствором. После этого дважды обмывали флакон фосфатным буферным раствором и, заполнив его 5 мл такого же раствора, содержащего 5 мМ глюкозы, оставляли при  $37^\circ\text{C}$  на 15 минут. Клетки, еще сохранившие адгезивность, снимали осторожным пипетированием.

В качестве интегрального теста для оценки потенциальной микробицидной ак-

тивности фагоцитирующих клеток (нейтрофилов и альвеолярных макрофагов) применялся НСТ-тест [17, 18]. Для проведения теста клеточную взвесь центрифугировали 5 мин. при 1500 об/мин. Для спонтанного теста клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл фосфатного буферного раствора и добавляли по 0,05 мл раствора НСТ в фосфатном буферном растворе. После инкубации в лунки добавляли по 0,1 мл фиксирующего раствора фуксина и в гемоцитометрической камере Горяева подсчитывали число формазан-положительных клеток. Качественные показатели НСТ-теста выражали в процентном отношении НСТ-положительных АМ. Степень интенсивности восстановления нитросинего тетразолия обозначалась следующим образом: 0 — отсутствие в цитоплазме диформаза; I — диформазон занимал 1/3–1/4 цитоплазмы клетки; II — диформазон занимал 2/3 цитоплазмы клетки; III — диформазон занимал всю цитоплазму.

Выраженность воспалительного процесса в нижних дыхательных путях изучали с применением качественно-количественного показателя — индекса активности эндобронхита (ИАЭ), который рассчитывали в процентах от максимального (27%) по формуле:  $\text{ИАЭ} = (\text{Э} + \text{Г} + \text{С}) \cdot /27 \cdot 100\%$ , где АЭ — активность эндобронхита *ad oculus* в баллах по известным критериям [9] (0 степень — 0 баллов; I, II, III ст. — 1, 2 или 3 балла, соответственно); Г — выраженность бронхиальной гиперсекреции в баллах (нет скопления секрета — 0 баллов; небольшая, умеренная и выраженная гиперсекреция — 1, 2 или 3 балла, соответственно); С — характер бронхиального секрета в баллах (слизистый — 1 балл, слизисто-гнойный — 2 балла, гнойный — 3 балла); Р — распространённость воспалительного процесса *ad oculus* в баллах (нет признаков воспаления — 0 баллов, изменения на уровне главных бронхов — 1 балл, частично диффузные изменения — 2 балла, диффузные изменения — 3 балла) [19].

Статистический анализ проводился с использованием пакета лицензионных программ «Statistica», «Microsoft Exel» [20]. Исследуемые группы проверялись на нормальность распределения с помощью одностроннего теста Колмогорова-Смирнова. Проводился расчет среднего арифметического и статистической ошибки среднего арифметического для каждого вариационного ряда ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ ), t-аргумента (Стьюдента) для определения различий средних величин, которые считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  и близкими к статистически

значимым при  $0,05 < p < 0,1$ . Наличие корреляционных взаимосвязей между изучаемыми показателями определены с помощью коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ) и коэффициента детерминации ( $r^2$ ).

Для характеристики интервала индивидуальной нормы использовался метод дисперсионного анализа для расчета наименьшей существенной разницы. Методами регрессионного анализа была проанализирована частота возникновения патологического процесса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В некоторых исследованиях [21, 22] было установлено, что присутствие в БАС десквамированных эпителиоцитов свидетельствует о развитии воспалительных изменений бронхиального дерева. При изучении показателей ЭПЦ у больных с СД 1 типа обнаружены изменения в системе местной защиты бронхов и легких, проявляющиеся изменением количественных показателей, метаболической и функциональной активности клеток бронхоальвеолярного пространства.

В группе больных с СД 1 типа жизнеспособность эпителиоцитов (ЖЭ) бронхиального дерева была статистически значимо ниже (на 11,2 %) при сравнении с аналогичными показателями в контрольной группе ( $p \leq 0,01$ ), при этом статистически значимых изменений жизнеспособности альвеолярных макрофагов (ЖАМ) у больных с СД 1 типа при сравнении с контрольной группой в результате проведенных исследований не было выявлено (рис. 1).

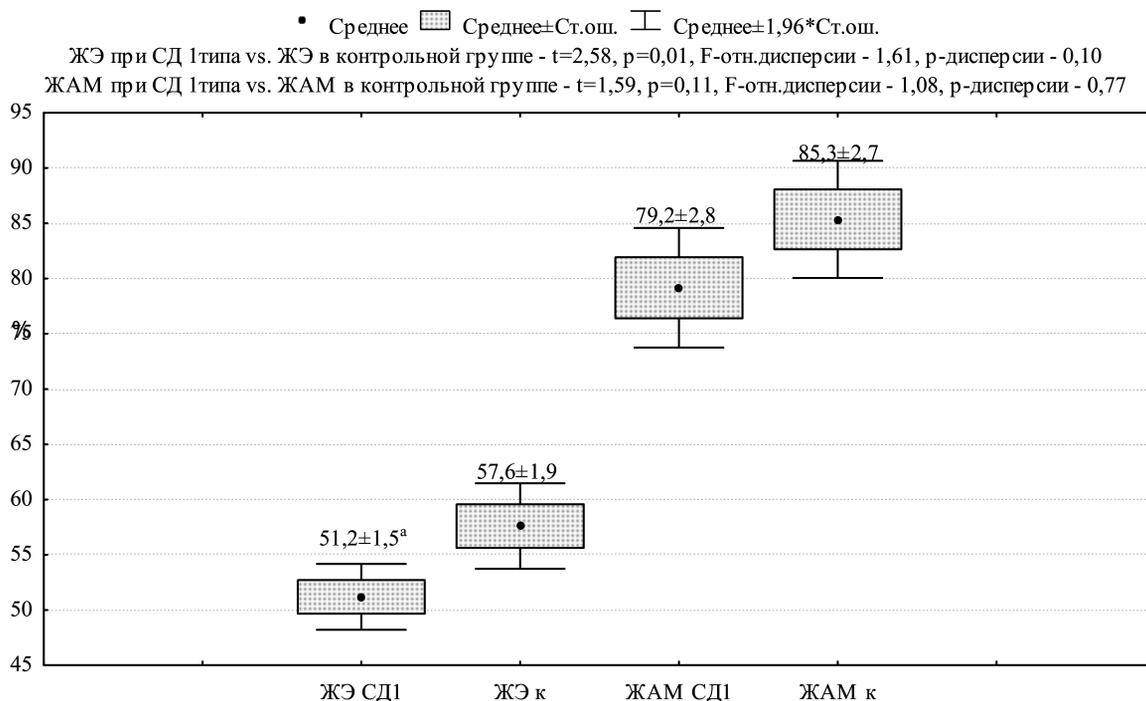


Рис. 1. Жизнеспособность эпителиоцитов и альвеолярных макрофагов бронхоальвеолярного секрета в исследуемых группах (<sup>a</sup> —  $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой).

По мнению некоторых авторов, именно снижение ЖЭ является критерием формирования острой фазы воспаления [23]. Однако в данном исследовании у пациентов с СД 1 типа снижение ЖЭ, вероятно, связано с воздействием эндогенных факторов, приводящих к нарушению целостности клеточной мембраны, изоляции внутренней среды клетки от ее окружения с последующим развитием или прогрессированием хронического воспалительного процесса.

Среди активных факторов неспецифической защиты бронхо-легочной системы важное место занимают высококодифференцированные клетки легких — АМ. Способность АМ поглощать чужеродный материал тесно связана с их жизнеспособностью и является одним из показателей их функционального состояния [24]. Оценивая функциональное состояние НСТ-положительных АМ, выделенных из БАС, в исследуемой группе пациентов с СД 1 типа мы обнаружили статистически значимое уменьшение показателя (на 18,2%) ( $p \leq 0,01$ ) при сравнении с контрольной группой (см. рис. 2).

У пациентов с СД 1 типа частота встречаемости НСТ-положительных АМ наблю-

далась в интервале от 18,4 до 34,4% у 37 человек (75,5%), тогда как в контрольной группе наибольшая частота распределения НСТ-положительных АМ наблюдалась в значении от 15,1 до 31,1% у 32 (68,1%).

Установленное снижение активности АМ, способных восстанавливать нитросиний тетразолий, отражало нарушенное состояние кислородзависимых механизмов бактерицидности АМ у больных с СД 1 типа и выявляло процент клеток, способных к завершённому фагоцитозу, что совпадает с мнением других авторов [25].

Цитологическое изучение материала ЭПЦ позволило зарегистрировать статистически значимое уменьшение (на 15,2%) поглотительной способности АМ у больных с СД 1 типа при сравнении с результатами в контрольной группе ( $p = 0,0009$ ) (см. рис. 3).

При сравнительной оценке ФИ в группах, у лиц с СД 1 типа, изучаемый показатель был на 13,8% меньше чем в контроле ( $p = 0,016$ ) (см. рис. 4).

Полученные данные согласуются с мнением некоторых учёных, предполагающих,

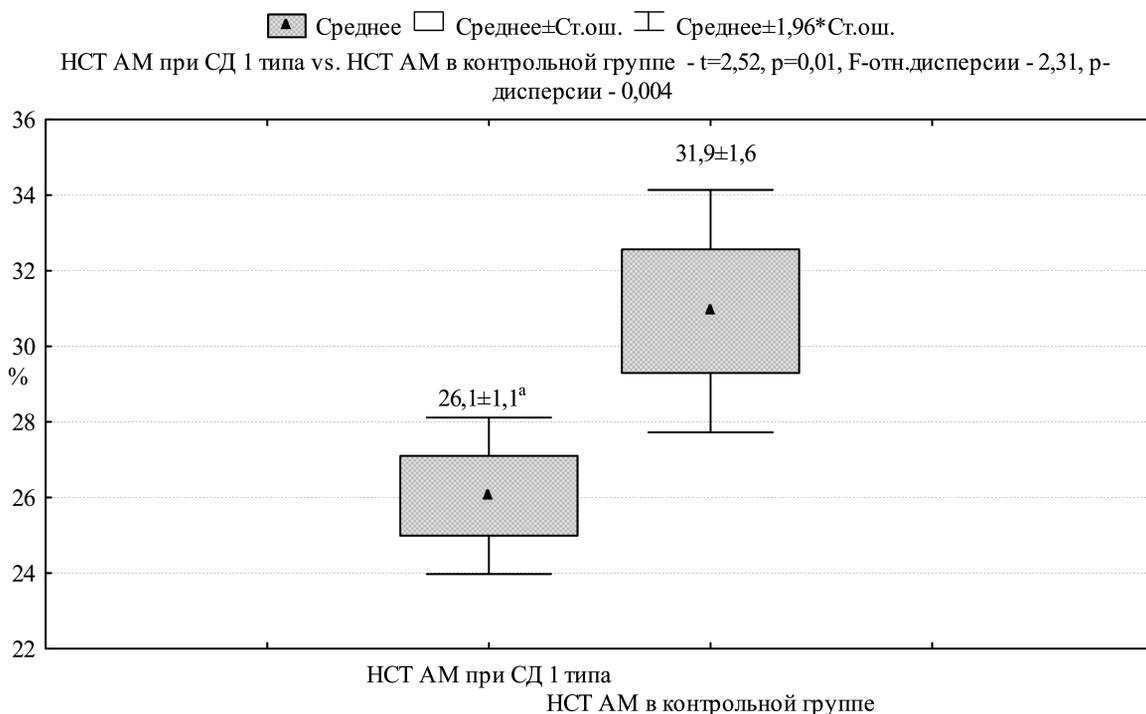


Рис. 2. НСТ-положительные альвеолярные макрофаги жидкости бронхоальвеолярного лаважа в исследуемых группах (<sup>a</sup> —  $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой).

что наличие хронического воспалительного процесса в слизистой оболочке бронхов значительно повышает дефектность иммуно-

компетентных и фагоцитирующих клеток, усиливает интенсивность аутоиммунных реакций, увеличивает изменения в клеточном

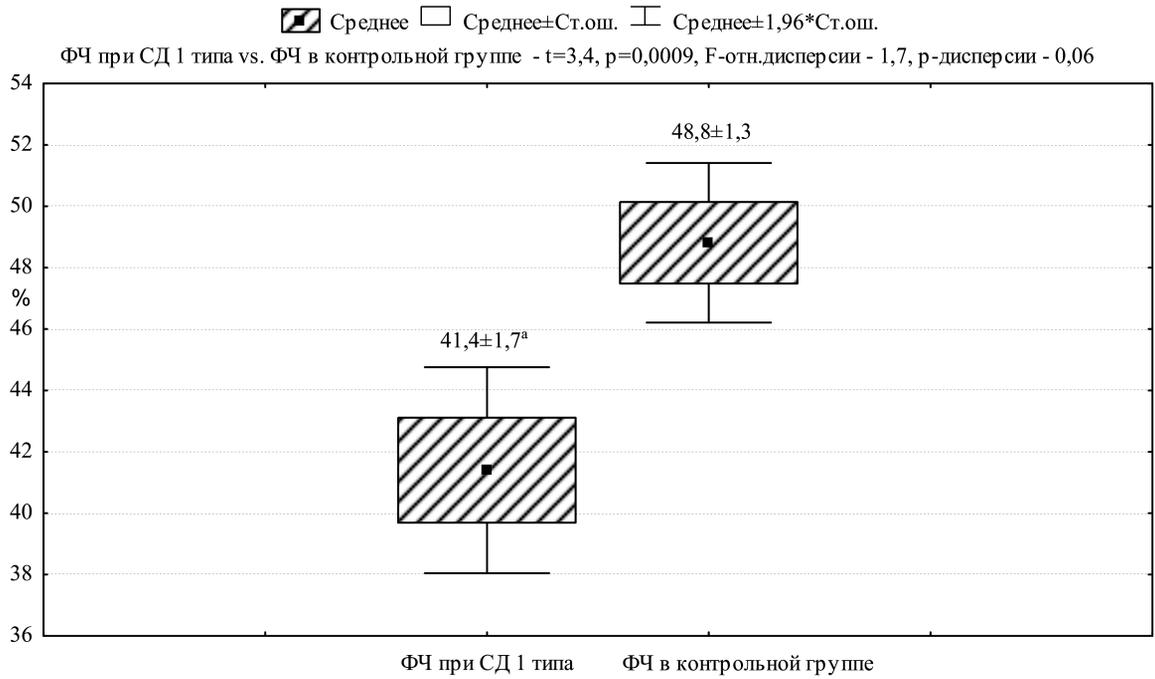


Рис. 3. Показатель фагоцитарного числа в исследуемых группах (<sup>a</sup> —  $p < 0,001$  при сравнении с контрольной группой).

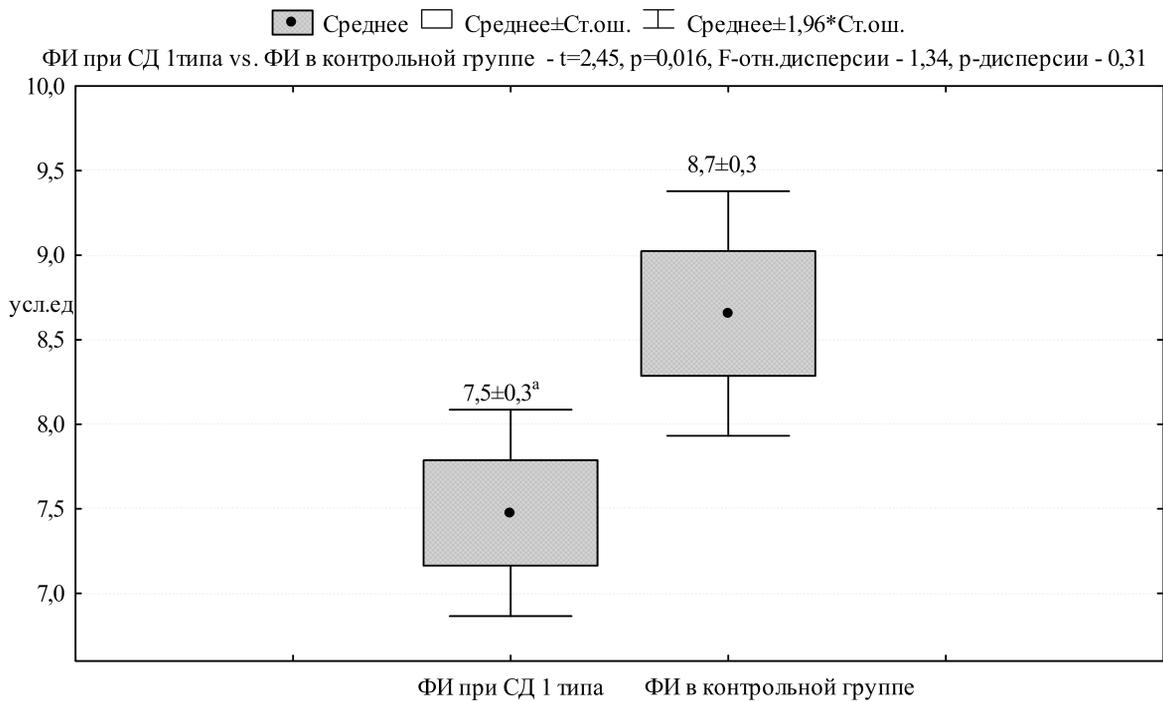


Рис. 4. Показатель фагоцитарного индекса в исследуемых группах (<sup>a</sup> —  $p < 0,01$  при сравнении с контрольной группой).

составе лаважной жидкости и функциональной активности АМ [26].

Результаты исследования количества нейтрофилов бронхоальвеолярной жидкости показали, что в группе больных с СД 1 типа абсолютное число нейтрофилов было на 67,3% больше чем в контрольной группе. Наибольшая частота встречаемости абсолютного числа нейтрофилов приходилась на интервал от  $0,02 \times 10^5/\text{мл}$  до  $0,22 \times 10^5/\text{мл}$  у 42 (85,7%) пациентов, тогда как в контрольной группе — от  $0,043 \times 10^5/\text{мл}$  до  $0,063 \times 10^5/\text{мл}$  у 26 (55,3%) человек.

Обнаруженное статистически значимое повышение численности нейтрофилов в бронхоальвеолярном пространстве у пациентов с СД 1 типа (на 67,3%) при сравнении с данными практически здоровых лиц ( $p=0,01$ ) может быть обусловлено направленной миграцией циркулирующих нейтрофилов в легкие и сопряжено с перераспределением нейтрофилов между компартментами организма в результате воспалительного процесса респираторной системы.

В ходе работы была проанализирована динамика клеточных параметров ЭПЦ

под воздействием различных факторов. На момент обследования у пациентов с СД 1 типа установлена статистически значимая корреляционная взаимосвязь между ЖАМ и ИАЭ ( $r^2=0,61$ ;  $r=-0,78$ ;  $p=0,0000$ ), а также ЖАМ и длительностью нарушений углеводного обмена ( $r^2=0,16$ ;  $r=-0,40$ ;  $p=0,003$ ) (см. рис. 5).

В последние годы накапливается всё больше данных в пользу представления о существенной роли длительного воздействия гипергликемии на различные органы и системы организма [27]. Согласно корреляционной связи признаков в исследовании выявлено статистически значимое влияние длительности заболевания СД 1 типа на показатель ФЧ ( $r^2=0,15$ ;  $r=-0,38$ ;  $p=0,005$ ), и ФИ ( $r^2=0,09$ ;  $r=-0,30$ ;  $p=0,03$ ).

Данные, полученные нами при исследовании показателей ЭПЦ, указывают на наличие у пациентов с СД 1 типа без клинических проявлений бронхо-пульмонарных заболеваний изменений в трахеобронхиальном дереве и лёгких в виде подострых воспалительных реакций и нарушений в системе защитной функции дыхательной системы.

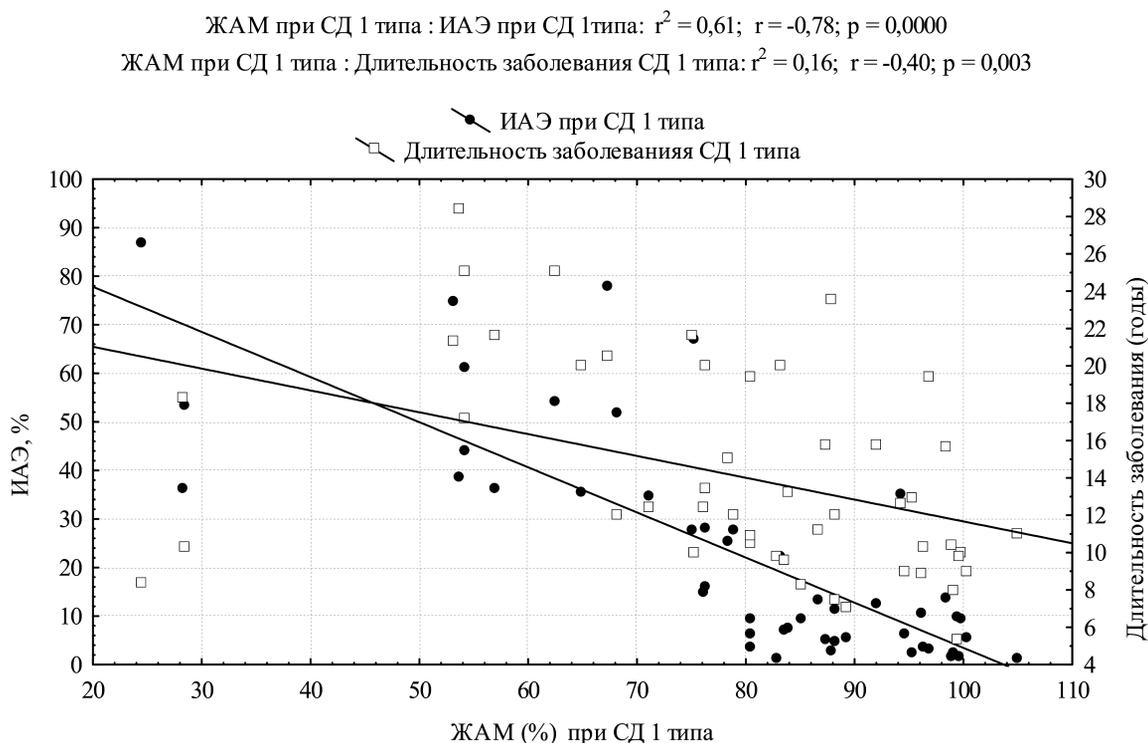


Рис. 5. Корреляционная взаимосвязь между жизнеспособностью альвеолярных макрофагов, индексом активности эндобронхита и длительностью заболевания сахарным диабетом 1 типа.

## ВЫВОДЫ

1. Изучение показателей эндопульмональной цитограммы является наиболее специфичным и информативным методом распознавания заболеваний бронхолегочной системы у пациентов с сахарным диабетом 1 типа на раннем этапе развития.
2. У пациентов с СД 1 типа наблюдается угнетение функционирования и жизнеспособности, метаболической активности эпителиоцитов и высокодифференцированных клеток (АМ) в бронхоальвеолярном секрете, что является показателем прогрессирования заболевания дыхательной системы и более глубокого поражения трахеобронхиального дерева и респираторной системы в целом.
3. Увеличение цитоза в группе пациентов с сахарным диабетом 1 типа обусловлено увеличением абсолютного числа нейтрофилов, что может быть связано с увеличением миграции в бронхоальвеолярное пространство форменных элементов крови.
4. Констатировано негативное воздействие длительного периода гипергликемии и тяжести воспалительного процесса в трахеобронхиальном дереве как на жизнеспособность клеток моноцитарно-макрофагальной системы, так и на клеточные механизмы неспецифической защиты у пациентов с сахарным диабетом 1 типа.

ЛИТЕРАТУРА  
(REFERENCES)

1. Berger KI, Reibman J, Oppenheimer BW, et al. *Chest* 2013; 144(1): 249–257.
2. Xin Jiang GW, Bai C. *Chest* 2010; 138(4):565A.
3. Avcyn AP. *Sov Medicina* 1982; 7:8–11.
4. Gerasin VA. *Terapevt Arh* 1981; 5:102–105.
5. Dobryh VA, Mun IE, Medvedeva EV, et al. *Ti-hookeanskij Med Zhurn* 2011; 2:85–88.
6. Gerasin VA Bronhoskopicheskie issledovaniya v diagnostike nespe-cificheskikh zabolevanij legkih, *Moskva*, 1988: 21 p.
7. Zinov'ev SV. Rukovodstvo po morfologii kletok bronhoal'veoljarnogo lavazha, *Blagoveshensk*, 2010: 206 p.
8. Alexopoulos EC, Bouros D, Dimadi M. *J Occup Med Toxicol* 2011; 6:23–25.
9. Cordeiro CR, Cemlyn-Jones J. *Europ Respiratory J* 2008; 4:320–324.
10. Samsonova MV. Atmosfera. *Pul'monologija i Allergologija* 2006; 4:8–12.
11. Morfologicheskie i citologicheskie issledovaniya v diagnostike bronholegochnoj patologii, *Moskva*, 1995: 17 p.
12. Ohshimo S, Bonella F, Cui A, et al. *Am J Respiratj Crit Care Med* 2009; 179:1043–1047.
13. Erohin VV. Funkcional'naja morfologija respiratornogo otdela legkih, *Moskva*, 1987: 372 p.
14. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, et al. *Europ Respiratory J* 2008; 31(2):416–469.
15. Gol'dberg ED. Laboratornye metody issledovaniya sistemy gemostaza, *Tomsk*, 1980: 313 p.
16. Bykov VL. Chastnaja gistologija cheloveka, *Sankt-Peterburg*, 2001: 304 p.
17. Haitov RM. Jekologicheskaja immunologija, *Moskva*, 1995: 219 p.
18. Viksman ME. Sposob ocenki funkcional'noj aktivnosti nejtrofilov cheloveka po reakcii vosstanovlenija nitrosinogo tetrazolija, *Kazan'*, 1979: 11 p.
19. Armin E. Introduction to Bronchoscopy, *New York*, 2009: 178 p.
20. Rebrova OJu. Statisticheskij analiz medicinskih dan-nyh, *Moskva*, 2006: 305 p.
21. Profita M, Sala A, Bonanno A. *Lung Physiology* 2010; 298(2):261–269.
22. Metso T, Venge P, Haahtela T, et al. *Thorax* 2002; 57(5):449–451.
23. Chuchalin AG. *Pul'monologija*, *Moskva*, 2009: 567 p.
24. Delclaux C, Azoulay E. *Europ Respiratory J* 2003; 22:10S–14S.
25. Berenson CS, Wrona CT, Grove LJ, et al. *Am J Respiratory Crit Care Med* 2006; 174:31–40.
26. Sibille Y, Reynolds HY. *Am Rev Respiratory Dis* 1990; 141:471 — 501.
27. Wannamethee SG, Shaper AG, Rumley A, et al. *Diabetes Care* 2010; 33:1990–1996.

## ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЕНДОПУЛЬМОНАЛЬНОЇ ЦИТОГРАМИ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 1 ТИПУ

Півоварова О. А.

*Луганський державний медичний університет  
aksiniyalosk@mail.ru*

У роботі представлені функціональні цитологічні критерії ендопульмональної цитограми у пацієнтів, хворих на цукровий діабет 1 типу без ознак легеневої патології. Виявлені порушення дозволяють визначити стан клітинних механізмів неспецифічного захисту бронхів і легенів при інсуліновій недостатності. Показано, що тривалий вплив гіперглікемії на дихальні шляхи викликає субклінічний ендобронхіт, пов'язаний з підвищенням активності нейтрофілів і пригніченням функціональної активності альвеолярних макрофагів у пацієнтів з цукровим діабетом 1 типу.

**Ключові слова:** цукровий діабет 1 типу, ендопульмональна цитограма, неспецифічний захист респіраторної системи.

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭНДОПУЛЬМОНАЛЬНОЙ ЦИТОГРАММЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Півоварова О. А.

*Луганский государственный медицинский университет  
aksiniyalosk@mail.ru*

В работе представлены функциональные цитологические критерии энопульмональной цитограммы у пациентов с сахарным диабетом 1 типа без признаков легочной патологии. Выявленные нарушения позволяют определить состояние клеточных механизмов неспецифической защиты бронхов и легких при инсулиновой недостаточности. Показано, что длительное воздействие гипергликемии на дыхательные пути вызывает субклинически протекающий эндобронхит, связанный с повышением активности нейтрофилов и угнетением функциональной активности альвеолярных макрофагов у пациентов с сахарным диабетом 1 типа.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, энопульмональная цитограмма, неспецифическая защита респираторной системы.

## DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE ENDOPULMONARY CYTOGRAM IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS

O. A. Pivovarova

*Lugansk State Medical University  
aksiniyalosk@mail.ru*

This paper presents the functional cytologic criteria of the endopulmonary cytogram in patients with type 1 diabetes without signs of pulmonary pathology. Identified violations can determine the state of the cellular mechanisms of non-specific protection of the bronchus and lungs in the insulin deficiency. It was shown that prolonged exposure of the hyperglycemia on the respiratory tract induced the subclinical flowing endobronchitis associated with increased activity of neutrophils and inhibition of functional activity of alveolar macrophages in patients with type 1 diabetes.

**Key words:** type 1 diabetes mellitus, endopulmonary cytogram, non-specific protection of respiratory system.