

UDK 611.341-02:616.348-002-06:616.379-008.64]-092.9
DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2019.1.10516Н. В. Ліснянська¹, П. І. Бучко², В. А. Мусієнко³ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет МОЗ України»¹Чортківський державний медичний коледж²Комунальне неприбуткове підприємство «Ружинська центральна лікарня»³

МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ ІЗ ХРОНІЧНИМ ЕНТЕРОКОЛІТОМ НА ТЛІ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ

Морфометрична характеристика тонкої кишки щурів із хронічним ентероколітом на тлі стрептозотоцинового діабету

Н. В. Ліснянська, П. І. Бучко, В. А. Мусієнко

ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет МОЗ України»

Чортківський державний медичний коледж

Комунальне неприбуткове підприємство «Ружинська центральна лікарня»

Morphometric characteristics of the small intestine of rats with chronic enterocolitis on the background of streptozotocin diabetes

N. V. Lisnianska, P. I. Buchko, V. A. Musienko

Bukovinian State Medical University

Chortkiv State Medical College

Municipal Non-Profit Enterprise «Ruzhyn Central Hospital»

e-mail: lisnianska.nata@bsmu.edu.ua

Резюме. Патобіохімічні зміни в клітинах кишкового епітелію при різноманітних хронічних патологіях, у тому числі й цукровому діабеті, є одним із суттєвих механізмів прогресування захворювання з розвитком поліорганної недостатності.

Мета дослідження – встановити морфометричні зміни стінки тонкої кишки тварин із стрептозотоциновим діабетом (СТД), хронічним ентероколітом (ХЕК) та їх поєднанням.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 120 білих нелінійних самцях-щурах з дотриманням принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Цукровий діабет моделювали шляхом однократного внутрішньочеревного введення тваринам стрептозоточину («Sigma Aldrich», США, в дозі 60 мг/кг маси тіла). Хронічний ентероколіт відтворювали шляхом вільного доступу тварин до 1,0 % розчину карагінану в питній воді протягом 1 місяця.

Результати. За результатами мікрморфометрії важливим індикатором дистрофічних змін слизової оболонки у щурів із СТД було істотне зростання частки ушкоджених епітеліоцитів: від контрольного значення (4,47±0,34) % до (16,00±0,59) %. При ХЕК мали місце прояви дистрофії та атрофії, хоча і менш виражені, ніж при експериментальній гіперглікемії: кількість ворсинок зменшувалася на 7,23 %, крипти поглиблювалися на 12,84 %, частка уражених клітин епітелію зростала на 7,83 %. Максимально вираженими були патологічні зміни, які реєстрували при ХЕК на тлі СТД: слизова оболонка стонщувалася на 12,49 %, кількість ворсинок істотно зменшувалася на 44,03 %, частка ушкоджених епітеліоцитів сягала (23,63±0,79) %, зростаючи на 19,17 % щодо контрольної групи.

Висновки. Структурні зміни стінки тонкої кишки білих щурів із СТД характеризуються переважанням

©Н. В. Ліснянська та ін., 2019

Summary. Pathobiochemical changes in cells of the intestinal epithelium in various chronic pathologies, including diabetes, is one of the essential mechanisms of disease progression with the development of multiple organ failure.

The aim of the study – to determine the morphometric changes of the wall of the small intestine of animals with streptozotocin diabetes (STD), chronic enterocolitis (CEC) and their combination.

Materials and Methods. The study was conducted on 120 white non-linear male rats complied with the principles of the European Convention for the Protection of Laboratory Animals. Diabetes mellitus was modeled by single intraperitoneal administration of streptozotocin to animals (Sigma Aldrich, USA, at a dose of 60 mg/kg body weight). Chronic enterocolitis was reproduced by free animal access to 1.0 % solution of carrageenan in drinking water for 1 month.

Results. According to the results of micromorphometry, an important indicator of dystrophic mucosal changes in rats with STD was a significant increase of the proportion of damaged epitheliocytes vs. control value (4.47±0.34) % to (16.00±0.59) %. In CEC, there were manifestations of dystrophy and atrophy, although less pronounced than in experimental hyperglycemia: the number of villi decreased by 7.23 %, crypts – increased by 12.84 %, the proportion of affected epithelial cells increased by 7.83 %. The most pronounced pathological changes were registered in rats with CEC + STD: the mucous membrane was decreased by 12.49 %, the number of villi significantly decreased too (by 44.03 %), the proportion of damaged epitheliocytes reached (23.63±0.79) %, increasing by 19.17 % vs. control.

Conclusions. Structural changes of the wall of the small intestine of white rats with STD are characterized by the prevalence of dystrophic and atrophic processes,

дистрофічних і атрофічних процесів, у тварин із ХЕК переважає картина хронічного запалення, тоді як моделювання ХЕК на тлі STD указує на поєднання дистрофічних і атрофічних змін та ентериту.

Ключові слова: стрептозотоциновий діабет; хронічний ентероколіт; тонка кишка; морфометрія; експеримент.

ВСТУП

Поширеність цукрового діабету в даний час досягла епідемічних значень, оскільки у 2011 р. офіційно понад 366 млн людей в усьому страждали від цієї недуги [1]. Відповідно до даних Міжнародної федерації діабету, в 2015 р. приблизно 415 млн людей в усьому світі хворіли на цукровий діабет [2]. Постійне збільшення поширеності даного захворювання й в Україні зокрема, пов'язане з урбанізацією, старінням населення, стресами, збільшенням відсотка людей з ожирінням, малорухливим способом життя, зміною якості їжі та зростанням споживання продуктів, що містять приховані жири і вуглеводи, генетично модифіковані компоненти [3–5]. Шлунково-кишкові прояви при цукровому діабеті можуть траплятися у 76 % хворих на цукровий діабет [6]. Існує все більше доказів того, що основними механізмами патогенезу діабетичних ускладнень є певні генетичні та епігенетичні модифікації, харчові фактори і малорухливий спосіб життя [7]. Патобіохімічні зміни в клітинах кишкового епітелію при різноманітних хронічних патологіях є одними із суттєвих механізмів прогресування захворювання з розвитком поліорганної недостатності. На сьогодні існує значна кількість літературних джерел, в яких показано, що патологічні зміни у тонкій кишці займають важливе місце в симптомокомплексі ушкоджень при експериментальному цукровому діабеті [8–10].

Метою дослідження було встановити морфометричні зміни стінки тонкої кишки тварин із цукровим діабетом, хронічним ентероколітом та їх поєднанням.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведено на 120 білих нелінійних самцях-щурах, яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Під час роботи дотримувалися принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Піддослідних щурів поділили на чотири групи: перша – контрольна (інтактні тварини), друга – щури з цукровим діабетом, третя – тварини з хронічним ентероколітом, четверта – щури з цукровим діабетом і хронічним ентероколітом. Цукровий

the picture of chronic inflammation is predominant in CEC animals, whereas the modeling of CEC against the background of STD indicates a combination of dystrophic and atrophic changes and enteritis.

Key words: streptozotocin diabetes; chronic enterocolitis; small intestine; morphometry; experiment.

діабет (STD) моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення тваринам віком 2 місяці стрептозоточину («Sigma Aldrich», США, в дозі 60 мг/кг маси тіла) [11]. Безпосередньо перед введенням стрептозоточину розчиняли в 0,1 мольному цитратному буфері (рН 4,5); контрольній групі вводили відповідну кількість цитратного буфера. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози не нижче 10,8 ммоль/л через 2 тижні після введення стрептозоточину. Хронічний ентероколіт відтворювали шляхом вільного доступу тварин до 1,0 % розчину карагану в питній воді протягом 1 місяця [12]. Евтаназію тварин проводили шляхом пункції серця під глибокою анестезією, відповідно до вимог Комітету з догляду за тваринами [13].

Морфометричні вимірювання здійснювали на гістологічних мікропрепаратах клубової кишки із застосуванням методів і рекомендацій Г. Г. Автанділова. Визначали товщину слизової, м'язової, серозної оболонки і підслизової основи, довжину, ширину ворсинок, глибину та ширину крипт, відносний об'єм уражених епітеліоцитів. Враховували при цьому також підслизово-слизовий і підслизово-м'язовий індекси, використовуючи відношення меншої величини до більшої. Для якісного морфометричного аналізу гістологічних препаратів застосовували систему візуального аналізу зображення із використанням відеокамери Vision Color CCD і програми Inter Video Win DVR, UTHSCSA Image Tool.

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Excel» («Microsoft», США) та STATISTICA 6.0 («Statsoft», США) з використанням параметричних і непараметричних методів оцінки одержаних даних. Для усіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за критерієм Стьюдента, в інших випадках – за допомогою U -критерію Мана–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для об'єктивної оцінки міри вираження структурних змін проводили морфометричне дослідження тканинних елементів стінки кишечника білих щурів. У контрольній та експериментальних групах

кількість спостережень склала 30, оскільки в кожній із них вимірювання здійснювали в 6 тварин, при цьому в кожного щура досліджували фрагменти з п'яти ділянок клубової кишки. Отримані результати відображено в таблиці.

Як свідчать дані морфометрії (рис.), у гризунів другої групи мало місце стоншення слизової оболонки кишечника на 25,34 % порівняно з інтактними тваринами. При цьому на 40,79 % зменшувалася кількість ворсинок на одиницю площі, а їх висоту і ширину регресували відповідно на 11,38 та 12,68 %. Одночасно глибина крипт збільшувалася на 19,18 %.

Важливим індикатором дистрофічних змін слизової оболонки у щурів другої групи було іс-

тотне зростання частки ушкоджених епітеліоцитів: від контрольного значення ($4,47 \pm 0,34$) % до ($16,00 \pm 0,59$) %.

У третій експериментальній групі, на відміну від другої, товщина слизової оболонки зростала, приріст складав 10,37 % (рис.). Значною мірою це відбувалося за рахунок збільшення висоти (на 7,26 %) та ширини (на 14,81 %) ворсинок. Механізм таких змін був зумовлений набряком слизової оболонки при запальному процесі. Водночас мали місце прояви дистрофії та атрофії, хоча і менш виражені, ніж при експериментальній гіперглікемії: кількість ворсинок зменшувалася на 7,23 %, крипти поглиблювалися на 12,84 %, частка уражених клітин епітелію зростала на 7,83 %.

Таблиця. Морфометрична характеристика тонкої кишки білих щурів із хронічним ентероколітом на тлі стрептозотоцинового діабету

Показник	Інтактні тварини (n=30)	Досліджувана група		
		друга (n=30)	третя (n=30)	четверта (n=30)
Товщина слизової оболонки (мкм)	$471,67 \pm 14,36$	$352,13 \pm 11,15^{***}$	$520,57 \pm 16,16^*$	$412,73 \pm 12,91^{**}$
Кількість ворсинок на 1 мм ² слизової оболонки	$217,03 \pm 7,68$	$128,50 \pm 4,42^{***}$	$201,33 \pm 6,21$	$121,47 \pm 4,54^{***}$
Висота ворсинок (мкм)	$314,70 \pm 11,06$	$278,90 \pm 9,45^*$	$337,53 \pm 11,26$	$263,63 \pm 8,28^{***}$
Ширина ворсинок (мкм)	$89,37 \pm 4,12$	$78,03 \pm 3,20^*$	$102,60 \pm 3,84^*$	$71,13 \pm 3,08^{***}$
Глибина крипт (мкм)	$147,17 \pm 6,62$	$175,40 \pm 7,52^{**}$	$166,07 \pm 5,69^{**}$	$183,27 \pm 7,72^{***}$
% ушкоджених епітеліоцитів	$4,47 \pm 0,34$	$16,00 \pm 0,59^{***}$	$12,30 \pm 0,52^{***}$	$23,63 \pm 0,79^{***}$

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з інтактними тваринами.

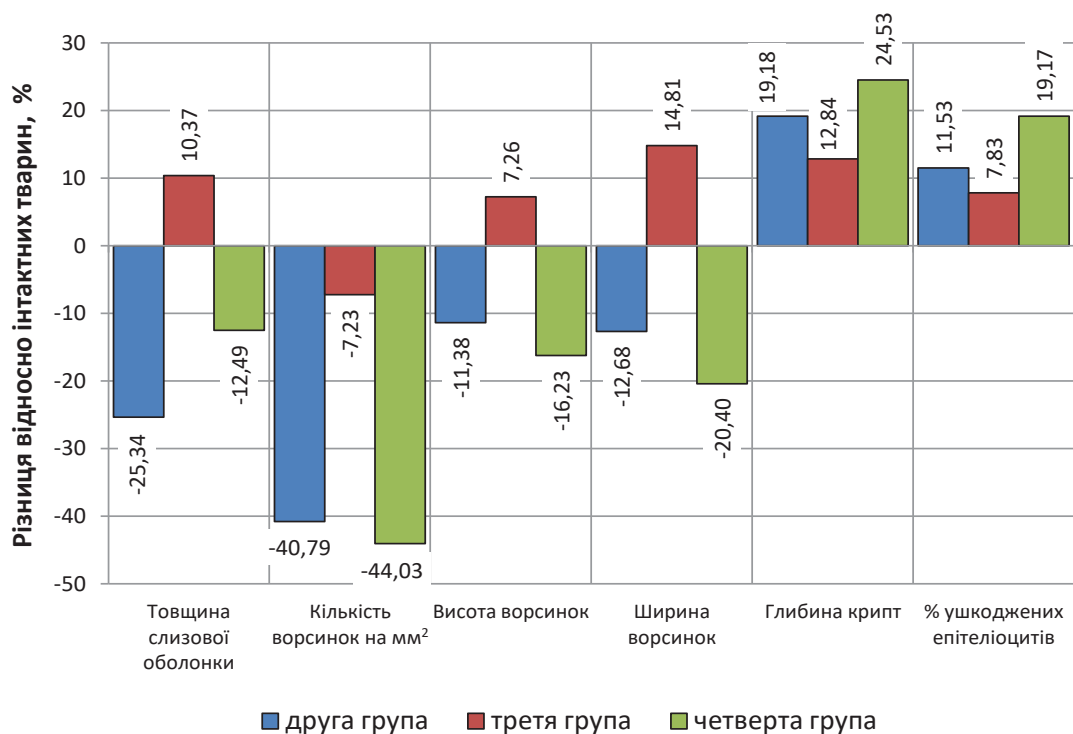


Рис. Динаміка змін морфометричних параметрів слизової оболонки кишечника білих щурів із хронічним ентероколітом на тлі стрептозотоцинового діабету.

Як при візуальному дослідженні гістологічних препаратів, так і за результатами мікроморфометрії максимально виражені патологічні зміни реєстрували в четвертій дослідній групі. Слизова оболонка стоншувалася на 12,49 %, кількість ворсинок істотно зменшувалася – на 44,03 %. Спостерігали значну регресію розмірів самих ворсинок: вкорочення на 16,23 % і звуження на 20,40 %. Глибина крипти слизової оболонки збільшувалася на 24,53 %. Частка ушкоджених епітеліоцитів сягала (23,63±0,79) %, зростаючи на 19,17 % щодо контрольної групи (рис.).

Підсумувавши та проаналізувавши отримані результати, можна зробити висновок, що структурні зміни стінки тонкої кишки білих щурів другої дослідної групи характеризуються превалюванням дистрофічних і атрофічних процесів, які можна вважати морфологічним відображенням глибоких обмінних порушень в умовах експериментальної гіперглікемії, найбільш ілюстративними морфометричними маркерами при цьому було зменшення кількості кишкових ворсинок на 40,79 % відносно інтактних тварин, зростання частки ушкоджених епітеліоцитів на 11,53 %. У третій групі переважала картина хронічного запалення, в четвертій групі – поєднання дистрофічних і атрофічних змін та ентериту, при цьому ступінь вираження морфологічних проявів був вищим, ніж при ізолюваному моделюванні вказаних патологічних станів. За результатами мікроморфометрії кількість ворсинок у третій групі зменшувалася на 7,23 %, у четвертій – на 44,03 %, відсоток ушкоджених епітеліоцитів збільшувався на 7,83 і 19,17 % відповідно.

Наведені результати у четвертій дослідній групі дозволяють прийти до висновку, що активація вільнорадикальних реакцій є важливим неспецифічним механізмом розвитку запалення тканин тонкої і товстої кишок на тлі цукрового діабету. Ла-

бораторним підтвердженням поєднання морфологічних ознак при ХЕК на тлі СТД є найвищі показники АФО в клітинах крові [14].

Аналіз вищенаведених даних дає підстави зробити висновок, що при цукровому діабеті на тлі гіперпродукції активних форм кисню структурні зміни стінки тонкої кишки білих щурів характеризуються превалюванням дистрофічних процесів. Попередні дані, які ми отримали, свідчать про те, що у тварин із хронічним ентероколітом високі концентрації фактора некрозу пухлин-альфа зумовлюють морфологічну картину запалення [15]. При хронічному ентероколіті на тлі стретозотоцинового діабету спостерігають поєднання ознак ентеропатії та ентериту з максимальними значеннями показників активних форм кисню і фактора некрозу пухлин-альфа, при цьому ступінь вираження патологічних змін був вищим, ніж при ізолюваному моделюванні вказаних патологічних станів.

ВИСНОВКИ

За результатами мікроморфометрії важливим індикатором дистрофічних змін слизової оболонки у щурів із СТД було істотне зростання частки ушкоджених епітеліоцитів: від контрольного значення (4,47±0,34) % до (16,00±0,59) %. При ХЕК мали місце прояви дистрофії та атрофії, хоча і менш виражені, ніж при експериментальній гіперглікемії: кількість ворсинок зменшувалася на 7,23 %, крипти поглиблювалися на 12,84 %, частка уражених клітин епітелію зростала на 7,83 %. Максимально виражені патологічні зміни реєстрували при ХЕК на тлі СТД: слизова оболонка стоншувалася на 12,49 %, кількість ворсинок істотно зменшувалася – на 44,03 %, частка ушкоджених епітеліоцитів сягала (23,63±0,79) %, зростаючи на 19,17 % щодо контролю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Atlas ID. Brussels, Belgium: international diabetes federation; 2011. International Diabetes Federation. 2013.
2. Federation ID. IDF Diabetes Atlas International Diabetes Federation. Brussels, Belgium. 2015.
3. ICES Atlas Primary care in Ontario. Chapter 12. Indicators of Primary care based on administrative data. Ontario, 2011.
4. Moini J. Epidemiology of Diabetes / J. Moini. – Elsevier; 2019.
5. The changes of activity of effector caspase cascade components in case of alimentary obesity in rats / M. Marushchak, I. Krynytska, L. Milevska [et al.] // Bangladesh Journal of Medical Science. – 2017. – Vol. 16, No 2. – P. 252–258.
6. Bekele G. Gastro intestinal manifestations of diabetes mellitus / G. Bekele, U. M. Kabadi // Int. J. Diabetes Dev. Countries. – 1996. – Vol. 16. – P. 54–58.
7. Kautzky-Willer A. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes

- mellitus / A. Kautzky-Willer, J. Harreiter, G. Pacini // Endocrine Reviews. – 2016. – Vol. 37, No. 3. – P. 278–316.
8. Марущак М. І. Особливості енергозабезпечення стінки тонкої кишки при хронічному ентероколіті на фоні стрептозотоциніндукованого діабету в щурів / М. І. Марущак, Н. В. Ліснянська, Г. Г. Габор // Вісник наукових досліджень. – 2017. – № 3. – С. 133–136.
9. Циммерман Я. С. Сахарный диабет и функционально-структурные изменения в гастродуоденальной зоне: клинико-эпидемиологическое исследование / Я. С. Циммерман, М. Р. Зинатуллин // Тер. архив. – 2011. – Т. 83, № 2. – С. 71–75.
10. Krynytska I. The indices of nitric oxide system in rats with carrageenan-induced enterocolitis combined with diabetes mellitus / I. Krynytska, M. Marushchak // Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases. – 2018. – Vol. 25, No. 3. – P. 283–288.
11. Indomethacin inhibits thymic involution in mice

with streptozotocin-induced diabetes / A. A. Mic, F. A. Mic, C. A. Tatu [et al.] // *Comparative Medicine*. – 2007. – Vol. 57, No 5. – P. 476–481.

12. Moyana T. N. Carrageenan-induced intestinal injury in the rat – a model for inflammatory bowel disease / T. N. Moyana, J. M. Lalonde // *Annals of Clinical & Laboratory Science*. – 1990. – Vol. 20, No. 6. – P. 420–426.

13. Резников О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Г. Резников // *Ендокринологія*. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.

14. Chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats: mechanism of oxidative stress development / N. V. Lisnianska, M. I. Marushchak, I. V. Antonyshyn [et al.] // *International Journal of Medicine and Medical Research*. – 2017. – Vol. 3, No. 2. – P. 59–63.

15. The mechanisms of apoptosis initiation in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes / M. Marushchak, N. Lisnianska, I. Krynytska [et al.] // *Georgian Medical News*. – 2017. – Vol. 270. – P. 125–130.

REFERENCES

1. Atlas ID. Brussels, Belgium: international diabetes federation; 2011. International Diabetes Federation; 2013.

2. Federation ID. IDF Diabetes Atlas International Diabetes Federation. Brussels, Belgium; 2015.

3. ICES Atlas Primary care in Ontario. Chapter 12. Indicators of Primary care based on administrative data. Ontario; 2011.

4. Moini J. *Epidemiology of Diabetes*. Elsevier; 2019.

5. Marushchak M, Krynytska I, Milevska L, Miz A, Mialiuk O. The changes of activity of effector caspase cascade components in case of alimentary obesity in rats. *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2017;23;16(2): 252-8.

6. Bekele G, Kabadi UM. Gastro intestinal manifestations of diabetes mellitus. *Int J Diabetes Dev Countries*. 1996;16: 54-8.

7. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*. 2016;1;37(3): 278-316.

8. Marushchak MI, Lisnianska NV, Habor HH. Features of energy supply to the small intestine wall in chronic enterocolitis on the background of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Visn nauk doslidz*. 2017;3: 133-6. Ukrainian.

9. Zimmerman YaS, Zinatullin MR. Diabetes mellitus and functional-structural changes in the gastroduodenal

zone: a clinical and epidemiological study. *Ter arkhiv*. 2011;83(2): 71-5. Russian.

10. Krynytska I, Marushchak M. The indices of nitric oxide system in rats with carrageenan-induced enterocolitis combined with diabetes mellitus. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*. 2018;1;25(3): 283-8.

11. Mic AA, Mic FA, Tatu CA, Ionac M, Ordodi VL, Paunescu V. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Comparative medicine*. 2007;57(5): 476-81.

12. Moyana TN, Lalonde JM. Carrageenan-induced intestinal injury in the rat – a model for inflammatory bowel disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1990;1;20(6): 420-6.

13. Reznikov OG. General ethical principles of animal experiments. *Endokrynolohiia*. 2003;8(1): 142-5. Ukrainian.

14. Lisnianska NV, Marushchak MI, Antonyshyn IV, Mialiuk OP. Chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats: mechanism of oxidative stress development. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2017;29;3(2): 59-63.

15. Marushchak M, Lisnianska N, Krynytska I, Chornomydz I. The mechanisms of apoptosis initiation in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes. *Georgian Medical News*. 2017;(270): 125-30.

Отримано 22.08.19