

## Дослідження м'язової оболонки сечового міхура при стрептозоточиновому діабеті

Попадинець О.Г.<sup>1</sup>, Юрах О.М.<sup>1\*</sup>, Токаруж Н.С.<sup>1</sup>, Долиб'яник Г.М.<sup>1</sup>, Бедей В.І.<sup>1</sup>, Юрах Г.Ю.<sup>1</sup>, Грициук М.І.<sup>1</sup>, Юрах А.О.<sup>2</sup>, Пастух М.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

<sup>2</sup>ДУ "Інститут урології НАМН України Київ, Україна

\*E-mail: o.yurakh@gmail.com

### Ключові слова:

- сечовий міхур
- стрептозоточин
- цукровий діабет
- морфометричний аналіз

### Анотація

Цукровий діабет (ЦД) викликає діабетичну цистопатію, яку пов'язують з дисфункцією детрузора і кількістю колагенових волокон у стінці сечового міхура (СМ). Результати досліджень, які проводилися раніше є неоднозначними і часто суперечливими, що вимагає об'єктивних даних, які можна отримати на основі одночасного визначення відносних площ гладких міоцитів і колагенових волокон у м'язовій оболонці.

Мета: встановити особливості структурної і метричної організації складових м'язової оболонки СМ щурів на етапах розвитку ЦД.

ЦД моделювали стрептозоточином у щурів лінії Wistar. Відносні площі досліджуваних структур визначали на цифрових зображеннях гістологічних зрізів СМ, забарвлених за Массоном з використанням оригінального автоматизованого способу. Гладкі міоцити досліджували також ультраструктурно.

Встановлено, що на 14–28 добу розвитку ЦД відбувається зменшення відсотка площі колагенових волокон і збільшення відсотка площі гладких міоцитів в стінці СМ. На 42 – 56 доби відсоток площі колагенових волокон збільшується, а відсоток площі гладких міоцитів зменшується. На 70-ту добу дослідження відсотки площі колагенових волокон і гладких міоцитів значимо не змінюються, більшість темних міоцитів інволютивні.

Висновки. На ранніх етапах розвитку ЦД в стінці СМ зменшується відсоток площі колагенових волокон і збільшується відсоток площі гладких міоцитів. У подальших термінах перебігу діабету спостерігається зворотній процес – збільшення відсотка площі колагенових волокон і зменшення відсотка площі гладких міоцитів. Розроблений авторами оригінальний спосіб визначення відносної площі структурних компонентів стінки СМ обумовлює принципово нові можливості проведення морфометричного аналізу.

## Вступ

Діабетичну дисфункцію сечового міхура пов'язують з дисфункцією м'яза-випорожнювача міхура, яка веде до зміни його скоротливої здатності. Одні автори вказують, що контрактильна здатність СМ збільшується [5], інші – знижується [9], а ще інші встановили, що на ранніх етапах перебігу цукрового діабету скоротливість м'яза-детрузора зростає, а на пізніх – зменшується [6, 7, 8]. Автори останніх

досліджень припускають, що в експериментах на щурах і мишах перехід від компенсованої до декомпенсованої дисфункції СМ відбувається на 9–12-й тижні після індукції ЦД стрептозотоцином. Ці зміни сечовидільної здатності СМ супроводжуються структурною перебудовою його м'язової оболонки. Так, гіпертрофію детрузора у різні терміни розвитку ЦД спостерігали ряд дослідників [10, 11], а А. А. Rodrigues і співавт. [13] гіпертрофії детрузора при алоксановому діабеті не виявили.

Колагенові волокна є основною складовою позаклітинного матриксу СМ і впливають на біомеханічні властивості його стінки [10]. С. С. Wang *et al.* [15], встановили, що стрептозотоциновий діабет збільшує піддатливість його тканини до розтягування, а G. Liu et F. Daneshgari [10] вважають, що це пов'язано зі зменшенням відсотка площі колагенових волокон. Однак, є роботи в яких встановлено, що відсоток площі фіброзу до загальної площі стінки СМ при ЦД не змінюються [13].

Звичайно, при таких різноманітних результатах одержати об'єктивні дані можна тільки на основі морфометричного дослідження. Для цього часто використовують товщину різних шарів стінки СМ [2, 9]. Однак, цей показник можна застосувати тільки для визначення загальної товщини стінки СМ і товщини уротелію, оскільки тільки вони мають чіткі межі. Об'єктивнішим є визначення площі складових стінки СМ. Однак, спосіб визначення площі, яка "вручну" чи автоматично обводиться межевою лінією [1], можливий тільки для визначення площі уротелію, що є епітеліальною тканиною, яка практично не містить міжклітинної речовини, вміст якої значно змінюється при набряку чи зневодненні організму.

**Мета:** встановити особливості структурної і метричної організації гладких міоцитів і колагенових волокон СМ щурів на етапах розвитку ЦД.

## Матеріал та методи

Дослідження проведене на 80-и дорослих щурах-самцях 1-річного віку лінії Wistar: 10 із них були інтактними (норма); 50-м (по 10 на кожний термін спостереження) моделювали цукровий діабет шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (60 мг/кг маси тіла), розчиненого в 0,1 М цитратному буфері; 20 були контрольними щурами (по 4 на кожний термін), яким внутрішньоочеревинно вводили тільки цитратний буфер. Забір матеріалу проводили на 14,28, 42,56 і 70-ту доби розвитку ЦД. Діабетичними щурами вважали тільки таких, які мали концентрацію глюкози в крові не менше як 12 ммоль/л.

Гістологічні зрізи забарвлювали трихромовим методом за Масоном. Електронно-мікроскопічне дослідження проводили згідно стандартної методики. Визначення відносних площ досліджуваних компонентів стінки СМ проводили в ImageJ v. 1.47 (НИН, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) [14] з використанням розробленого нами оригінального методу [3], який дозволяє представити площі гладких міоцитів, колагенових волокон і уротелію у відсотках до їхньої сумарної площі. Використовували методи непараметричної статистики (Wilcoxon-Mann-Whitney test), які проводили в R v. 3.0.

## Результати та обговорення

Будова м'язової оболонки СМ щурів мікроскопічно і ультраструктурно суттєво не відрізняється від такої, яка описана в класичних роботах. За результатами наших досліджень можемо доповнити, що в контрольних щурів у м'язовій оболонці СМ найчастіше зустрічаються світлі гладкі міоцити. Органели цих клітин знаходяться біля полюсів ядер. Мітохондрії розміщуються також ще і по всій площині зрізу міоцита і біля його плазмолем. Вони світлі з гребенями, різні за формою і розмірами. Цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки короткі, їх мало. Комплекс Гольджі представлений, в основному, короткими і вузькими трубочками та дрібними пухирцями. Біля мітохондрій розташовуються у невеликій кількості бета-гранули глікогену, які виглядають, у порівнянні з вільними рибосомами, менш електронно щільними і більшими за розмірами. Вільних рибосом багато. Є також у помірній кількості кавеоли і піноцитозні пухирці.

Результати отримані за допомогою розробленого нами способу представлені в таблиці 10.1.

Визначені нами відсотки площ досліджуваних компонентів стінки СМ контрольних тварин і динаміка гіпертрофії гладких міоцитів при ЦД схожі на такі як в роботі G. Liu *et al.* [10], так і Pitre *et al.* [12]. Однак терміни найвищого рівня гіпертрофії міоцитів були іншими. Ці розбіжності можна пояснити віком тварин – чим молодші щурі, тим скоріше розвивається гіпертрофія детрузора [10].

Табл. 10.1.: Результати морфометричного дослідження стінки СМ при стрептозотоциновому діабеті з використанням кольорової сегментації (Mean  $\pm$  SD)

Терміни досліджу, (доба)	Відсоток площі (%) досліджуваної структури стінки СМ до сумарної площі уротелію, колагенових волокон і гладких міоцитів	
	колагенові волокна	гладкі міоцити
контрольні щурі	38,57 $\pm$ 6,13	53,81 $\pm$ 6,66
14-а	33,74 $\pm$ 3,37 <sub>##</sub>	55,91 $\pm$ 5,56
28-а	20,85 $\pm$ 3,02 <sub>###</sub> ***	68,15 $\pm$ 4,15 <sub>###</sub> ***
42-а	23,29 $\pm$ 4,77 <sub>###</sub> *	67,54 $\pm$ 5,19 <sub>###</sub>
56-а	28,87 $\pm$ 5,35 <sub>###</sub> **	62,89 $\pm$ 5,62 <sub>###</sub> **
70-а	32,36 $\pm$ 5,43 <sub>###</sub>	60,76 $\pm$ 5,43 <sub>###</sub>

*Примітки:* Mean  $\pm$  SD – середнє значення показника  $\pm$  стандартне відхилення; статистично значима різниця з показниками: контрольних тварин <sub>##</sub> ( $p < 0,01$ ), <sub>###</sub> ( $p < 0,001$ ) і попереднім терміном дослідних щурів <sub>\*</sub> ( $p < 0,05$ ), <sub>\*\*</sub> ( $p < 0,01$ ), <sub>\*\*\*</sub> ( $p < 0,001$ ).

Нами встановлено, що у порівнянні з контрольними тваринами відсоток площі гладких міоцитів СМ починає зростати з 14-ї доби розвитку ЦД і на 28-му добу збільшується в 1,28 раза, що збігається з найбільшим у них добовим діурезом, який перевищує такий контрольних тварин у 15,8 раза ( $p < 0,001$ ) [4]. Ці результати подібні на дані інших дослідників, які вважають, що гіпертрофію гладких м'язів СМ при ЦД стимулює збільшений у рази діурез [6, 12]. Однак, ми встановили, що в наступні терміни відсоток площі гладких міоцитів СМ дослідних щурів зменшується. При цьому спостерігається певне відставання регресу гіпертрофії гладких міоцитів від ступеня зниження добового діурезу.

У нашому дослідженні (див. табл.) відсоток площі колагенових волокон стінки СМ спочатку зменшується і на 28-му добу досліджу стає меншим за такий у контрольних тварин в 1,85 раза. ( $p < 0,001$ ). Зменшення цього показника на ранніх етапах розвитку ЦД спостерігали також G. Liu et F. Daneshgari [10] і D. Pitre *et al.* [12]. У наступні два терміни цей показник, у порівнянні з 28-ю добою, статистично значимо починає зростає. Але і на 70 добу від початку розвитку ЦД відсоток площі колагенових волокон залишається меншим за контроль у 1,19 раза ( $p < 0,001$ ), а відсоток площі гладких міоцитів – більшим в 1,13 раза. Останнє вказує на те, що діабетична цистопатія щурів залишається компенсованою до кінця експерименту, який ми проводили. Нами також встановлено, що на всіх термінах спостереження в СМ спостерігаються як гладкі міоцити, які за ультраструктурною будовою суттєво не відрізняються від таких контрольних щурів, так і гладкі міоцити, що знаходяться в стані функціональної напруги.

## Висновки

1. Ранній період розвитку ЦД (14 – 28 доба) характеризується зменшенням відсотка площі колагенових волокон і збільшенням відсотка площі гладких міоцитів у стінці СМ. На 42 – 56 доби відсоток площі колагенових волокон збільшується, а відсоток площі гладких міоцитів зменшується. На 70-ту добу досліджу відсотки площі колагенових волокон і гладких міоцитів значимо не відрізняються від попереднього терміну.
2. Важливими особливостями діабетичної цистопатії, яка індукована стрептозотоцином, є виражений поліморфізм ультраструктурних змін гладких міоцитів, який має хронологічну залежність, а також те, що впродовж 70-и діб розвитку ЦД діабетична дисфункція СМ щурів залишається компенсованою.
3. Розроблений нами спосіб аналізу структурних компонентів стінки СМ в ImageJ дозволяє визначати відсотки площі гладких м'язів і колагенових волокон в автоматичному режимі і без урахування площі, яку займає основна речовина позаклітинного матриксу. Це обумовлює принципово нові можливості проведення морфометричного аналізу стінки СМ, які виражаються в усуненні суб'єктивного фактору, нівелюванні індивідуальної мінливості тварин і результатів, які залежать від різних ступенів розтягнення стінки міхура, набряку чи зневоднення.

## Література

- [1] Вітрук ЮВ, Романенко АМ. Гістологічні зміни в стінці сечового міхура при хронічній затримці сечі, спричиненій доброякісною гіперплазією передміхурової залози. Урологія. 2008;4(1):47-49.
- [2] Гнатюк МС, Несерук СО, Татарчук ЛВ. Морфометрична оцінка вікових особливостей ремоделювання структур стінки сечового міхура. Вісник наукових досліджень. 2013;1:119-120.
- [3] Токарук НС, винахідник; Токарук НС, патентовласник. Автоматизований спосіб визначення площ уротелію, колагенових і гладком'язових волокон на екваторіальних поперечних гістологічних зрізах сечового міхура експериментальних тварин. Патент України № 97270. 2015 бер. 10.
- [4] Токарук НС. Динаміка морфофункціональних змін сечового міхура щура за умов експериментального цукрового діабету. Галицький лікарський вісник. 2015;22(3, частина 2):95-99.
- [5] Christ GJ, Hsieh Y, Zhao W, Schenk G, Venkateswarlu K, Wang H-Z, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on bladder and erectile (dys)function in the same rat in vivo. BJU International [Internet]. 2006 May;97(5):1076-1082. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06058.x>
- [6] Daneshgari F, Liu G, Imrey PB. Time Dependent Changes in Diabetic Cystopathy in Rats Include Compensated and Decompensated Bladder Function. Journal of Urology [Internet]. 2006 Jul;176(1):380-386. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(06\)00582-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(06)00582-9)
- [7] Golbidi S, Laher I. Bladder Dysfunction in Diabetes Mellitus. Frontiers in Pharmacology [Internet]. 2010;1. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00136>
- [8] Hanna-Mitchell AT, Ruiz GW, Daneshgari F, Liu G, Apodaca G, Birder LA. Impact of diabetes mellitus on bladder uroepithelial cells. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology [Internet]. 2013 Jan 15;304(2):R84-R93. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00129.2012>
- [9] Leiria L, Mónica F, Carvalho F, Claudino M, Franco-Penteado C, Schenka A, et al. Functional, morphological and molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: evidence of a role for L-type voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels. British Journal of Pharmacology [Internet]. 2011 Jun 27;163(6):1276-1288. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01311.x>
- [10] Liu G, Daneshgari F. Temporal diabetes- and diuresis-induced remodeling of the urinary bladder in the rat. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology [Internet]. 2006 Sep;291(3):R837-R843. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00917.2005>
- [11] Munoz A, Boone TB, Smith CP, Somogyi GT. Diabetic plasticity of non-adrenergic non-cholinergic and P2X-mediated rat bladder contractions. Brain Research Bulletin [Internet]. 2013 Jun;95:40-45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.03.006>
- [12] Pitre DA, Ma T, Wallace LJ, Bauer JA. Time-dependent urinary bladder remodeling in the streptozotocin-induced diabetic rat model. Acta Diabetologica [Internet]. 2002 Apr 1;39(1):23-27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s005920200008>
- [13] Rodrigues Jr AA, Suaid HJ, Tucci Jr S, Fazan VPS, Foss MC, Cologna AJ, et al. Long term evaluation of functional and morphological bladder alterations on alloxan-induced diabetes and aging: experimental study in rats. Acta Cirurgica Brasileira [Internet]. 2008;23(suppl 1):53-58. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-86502008000700010>
- [14] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods [Internet]. 2012 Jun 28;9(7):671-675. Available from: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- [15] Wang CC, Nagatomi J, Toosi KK, Yoshimura N, Hsieh JH, Chancellor MB, et al. Diabetes-induced Alternations in Biomechanical Properties of Urinary Bladder Wall in Rats. Urology [Internet]. 2009 Apr;73(4):911-915. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2008.11.026>