4. Каспаров А.А. Трубчатые микродренажи и консервированный амнион при патологиях роговицы сочетающейся с глаукомой / А.А. Каспаров, С.А. Маложен, С.В. Труфанов // Вестник офтальмологии. – 2003. - № 4. – С. 10-14.
5. Липовецкая Е.М. Развитие экспериментальной глаукомы при длительном ведении адреналина / Е.М. Липовецкая // Офтальмологич. Журн. – 1966. - № 3. – С. 221-223.
6. Резніков О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О.Г. Резніков // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142-145.
7. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перова // -М.: Медицина, - 1996.- 542 с.
8. Хорошилова-Маслова И.П. Ингибирующее влияние комплекса цитокинов на заживление ран после глаукомофильтрующей операции в эксперименте (гистологические исследования) / И.П. Хорошилова-Маслова, Л.В. Ганковская, Л.Д. Андреева [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2000. - № 1. – С. 5-9.
9. Rotth A. Plastic repair of conjunctive defects with fetal membranes / A. Rotth // Arch. Ophtalmol. – 1990. – Vol. 23. – P. 522-525.
10. Tripathi R. Aqueous humor in glaneomatous eyus contains increased amounts of TGF- β / R. Tripathi // Invest. Opthalmol. Vis. Sci. – 1994. – Vol. 35. - № 4. – P. 2741 -2758.
11. Tsend S.C.G. Amniotic membrane transplantation for conjunctivae surface reconstruction / S.C.G. Tsend, T.P. Probhasawat, S.H. Lee // Am.j. opthalmol. – 1997. – Vol. 124. – P. 765-774.
12. Tseng S.C. G. Amniotic membrane transplantation with or without Limbal antografts for corneal surface reconstruction in patents with limbal sterm all deficiency / S.C.G. Tseng, P. Prabhasawat, K. Barton // Ach. Othalmol. – 1998. – Vol. 116. – P.431-441.

Реферати

ІНТРАСКЛЕРАЛЬНО-СУПРАЦИЛІАРНА ІМПЛАНТАЦІЯ АМНІОНУ С НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЮ МЕТОЮ ПРИ АДРЕНАЛІНІНДУКОВАНІЙ ГЛАУКОМІ
Малова Н.Г., Демин Ю.А., Казмірук І.Л.

В експерименті на моделі адреналін індукованій глаукоми вивчено терапевтичну ефективність кріоконсервованої амніотичної оболонки. Доведений терапевтичний ефект кріоконсервованного препарату з амніотичної оболонки який виражався зниженням набряку та зменшення деструктивних та запальних проявів у сітківці та зоровому нерві.

Ключові слова: адереналін індукована глаукома, сітківка, амніотична оболонка.

Стаття надійшла 25.09.2013 р.

INTRASCLERO-SUPRACILIAR IMPLANTATION OF AMNION WITH NEUROPROTECTIVE PURPOSE AT ADRENALINE INDUCED GLAUCOMA
Malova N.G., Demin J.A., Kazmiruk I.L.

In an experiment on the model of adrenaline induced glaucoma therapeutic efficiency of cryopreserved amnionic shell is studied. Well-proven therapeutic effect of cryopreserved preparation from a амніотичної shell which was expressed by the decline of edema and diminishing of destructive and used for setting fire displays in a retina and visual nerve.

Keywords: адереналініндукована glaucoma, retina, amnionic shell.

Рецензент Шепітько В.І.

УДК 616.831-001-06:616.379-008.64]-06:612.015.11-092.9

В.М. Мерецький, М.М. Корда
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського», м. Тернопіль

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ОКСИДАТИВНИМ СТРЕСОМ І ІНТЕНСИВНІСТЮ АПОПТОЗУ НЕЙТРОФІЛІВ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ І ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

Досліджено взаємозв'язок між ступенем оксидативного стресу у нейтрофілах крові та інтенсивністю апоптозу нейтрофілів при експериментальній черепно-мозковій травмі на фоні стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету. Встановлено, що за умов ЧМТ спостерігається різке зростання продукції активних форм кисню, збільшення кількості анексин V позитивних клітин, що сягає максимуму на 5 добу спостереження, і фракції лейкоцитів, позитивних за пропідію йодидом, особливо у періоді ранніх проявів після травми. Супутній цукровий діабет призводить до більш вираженого зростання явищ апоптозу і вільнорадикального окиснення в нейтрофілах. Зроблено висновок, що при ЧМТ, цукровому діабеті і, особливо, при ЧМТ на фоні цукрового діабету підвищується інтенсивність апоптозу нейтрофілів крові. Активність апоптотичних процесів корелює з вираженістю оксидативного стресу в нейтрофілах.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, цукровий діабет, активні форми кисню, апоптоз нейтрофілів.

Робота є фрагментом НДР «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних та біогенних токсикантів у біологічних системах», № держреєстрації 0112U000542.

Оксидативний стрес характеризується надмірним накопиченням у тканинах активних форм кисню (АФК), які призводять до посилення процесів ліпопероксидації, пошкодження нуклеїнових кислот і білків, пригнічення гліколізу та окисного фосфорилювання, інгібування активності ферментів, що в ході розвитку патологічного процесу може викликати загибель клітини за некротичним або апоптотичним механізмом. Невеликі (фізіологічні) кількості АФК постійно утворюються в процесі нормального фізіологічного функціонування біоенергетичних і нейрохімічних систем клітин організму. При цьому АФК виконують функції між- і внутрішньоклітинних мессенджерів і можуть забезпечувати адаптацію клітини до мінливих умов функціонування [1]. З іншого боку, вільнорадикальне окиснення є універсальним патофізіологічним феноменом при багатьох патологічних станах. Як правило, джерелом АФК в клітинах є мітохондрії, де в нормі кисень піддається чотирьохелектронному відновленню і перетворюється у воду. Проте, в умовах порушення енергоутворюючих процесів може відбуватися неповне відновлення кисню з утворенням високореактивних вільних радикалів.

Розвиток оксидативного стресу безпосередньо пов'язаний з активацією програмованої клітинної загибелі – апоптозом, який є найважливішим механізмом контролю клітинних популяцій у багатоклітинному організмі [1,4]. Активні форми кисню призводять до дезінтеграції внутрішньої мітохондріальної мембрани, що викликає втрату мітохондріального трансмембранного потенціалу, набухання матриксу з наступним розривом

зовнішньої мембрани мітохондрій із звільненням проапоптотичних білків (AIF, Smac, прокаспаза 9, цитохром *c*) із міжмембранного простору в цитозоль. Вихід цитохрому *c* призводить до різкого підвищення внутрішньоклітинного вмісту АФК і активації каспазного каскаду [4,13]. Характерним також є специфічне розщеплення ДНК, рибосомальної РНК і білків, підвищення внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію, транслокація фосфатидилсерину з плазматичної мембрани. Локалізація останнього на поверхні мембрани спостерігається починаючи з ранньої стадії апоптозу до повної деградації клітини [1]. Відомо, що, порівняно з іншими клітинами організму, продукція АФК є найбільш значущою в нейтрофільних лейкоцитах. Індукція окисного стресу ініціює розвиток програмованої загибелі нейтрофілів, які швидко вступають на шлях спонтанного апотозу, що не потребує будь-якого зовнішнього сигналу для їх відмирання [8].

Сучасна концепція патогенезу травматичного ураження органів і тканин розглядає апоптоз і некроз як два головні взаємопов'язані механізми загибелі клітин [2]. Дослідження в галузі патофізіології апоптозу є продуктивними для розуміння механізмів розвитку травматичної хвороби та відкривають широкі можливості для попередження, прогнозування та лікування її ускладнень.

Метою роботи було дослідити взаємозв'язок між ступенем оксидативного стресу у нейтрофілах крові та інтенсивністю апоптозу нейтрофілів при черепно-мозковій травмі (ЧМТ) на фоні стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету (ЦД).

Матеріал та методи дослідження. Експерименти проводились на 80 статевозрілих білих нелінійних щурах-самцях, поділених на чотири експериментальні групи: I (n=8) – інтактні тварини (контроль), II – щурі, яким моделювали черепно-мозкову травму (n=32), III – щурі з експериментальним цукровим діабетом (n=8), IV – щурі, яким моделювали ЧМТ на тлі ЦД (n=32). Тварини утримувались у стандартних умовах віварію у відповідності до санітарно-гігієничних норм та вимог GLP [6]. Всі етапи експериментів виконані згідно міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами відповідно до «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Експериментальний ЦД моделювали одномоментним введенням стрептозотоцину ("Sigma-Aldrich", США) в черевну порожнину в дозі 60 мг/кг [7]. Діабетиками вважали тварин з рівнем глюкози понад 14ммоль/л. Закриту ЧМТ моделювали за допомогою розробленої нами методики [5]. Тварини виводились з експерименту через 3 і 24 години (період гострої реакції на травму), 5 і 14 діб (період ранніх проявів) після травми [2] в умовах тіопентало-натрієвого наркозу.

Виділення нейтрофілів проводили методом градієнтного центрифугування [10]. Для вимірювання рівня активних форм кисню у нейтрофілах крові використовували дихлорфлуоресцеїну диацетат (ДХФ-ДА) («Sigma Aldrich», USA), який є барвником із заблокованою флуоресценцією [9]. Після пасивного проникнення в клітину і відщеплення ацетатної групи під дією естераз ДХФ-ДА переходить у полярну сполуку, яка не здатна до дифузії з клітини. У результаті взаємодії з перекисом водню та іншими вільними радикалами ДХФ-ДА стає флуоресціюючою сполукою. Рівень продукції АФК аналізували за інтенсивністю світіння барвника (FL-1 канал) на проточному цитофлуориметрі Epics XL («Beckman Coulter», США). Значення досліджуваного параметру виражали у відсотках.

Для оцінки апоптозу нейтрофілів крові використовували ФІТЦ-мічений анексин V (AN), що зв'язується з фосфатидилсерином на зовнішній поверхні плазмалеми, та пропідію йодид (PI) з набору реагентів «ANNEXIN V FITC» («Beckman Coulter», США) [12]. Аналіз проб проводили на проточному цитометрі Epics XL («Beckman Coulter», США) з аргоновим лазером, визначаючи декілька параметрів: мале кутове світлорозсіювання (FSC), що характеризує розмір клітини, бічне світлорозсіювання (SSC), що характеризує оптичну неоднорідність цитоплазми клітин, характер клітинних включень і гранулярність клітин, а також мембранні особливості клітини, і показник зеленої флюоресценції (флюоресцеїнізотіоціанат – ФІТЦ – 530 нм). Досліджувану популяцію клітин гейтували в координатах FSC (вісь абсцис) і SSC (вісь ординат), потім аналізували на наявність флуоресценції в координатах на основі Dot Plot (двопараметрична гістограма). Використовували автоматичне програмне забезпечення і методи збору та аналізу даних з високою роздільною здатністю (1024 канали). Отримані результати представляли у відсотках.

Дискримінаційний аналіз типу клітинної смерті включав: 1-й квадрант – клітини, негативні за анексином V і позитивні за PI – некроз; 2-ий квадрант — нейтрофіли, позитивні за PI і анексином V-FITC – пізня стадія апоптозу або некроз; 3-ій квадрант - нейтрофіли, негативні за PI і анексином V—FITC – життєздатні клітини; 4-ий квадрант – нейтрофіли, позитивні за анексином V-FITC і негативні за PI — рання стадія апоптозу (рис. 1). Результати досліджень опрацьовували статистично із застосуванням t-критерію Стьюдента для незалежних виборок.

Результати дослідження та їх обговорення. За допомогою методу проточної цитофлуориметрії можна виявити найбільш ранні події процесу апоптозу, зафіксувавши стадію, коли «приймається рішення» про перехід межі життєздатності і клітинної смерті. Відомо, що пропідіум йодид є маркером клітин, що знаходяться у пізньому апоптозі або некрозі (відбувається порушення цілісності клітинної мембрани, що дозволяє PI увійти в клітину і зв'язатися з ДНК). Найбільш ранньою подією, що передує апоптозу, є окиснення ліпідів клітинних мембран, що відбувається під впливом надлишкової продукції АФК. При цьому особливо вразливими є ненасичені жирнокислотні хвости кислих фосфоліпідів, представлені в мембранах в основному фосфатидилсерином.

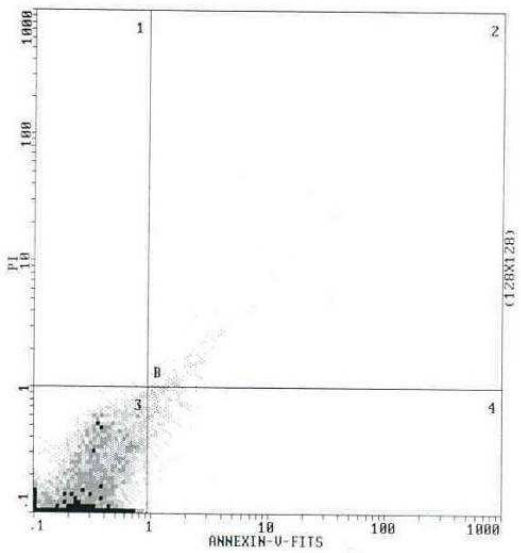

Рис. 1. Розподіл апоптичних і життєздатних клітин в режимі DotPlot. По осі абсцис – інтенсивність флюоресценції анексину V — FITC. По осі ординат — інтенсивність флюоресценції PI.

Утворення гідроперекисів фосфатидилсерину порушує його взаємодію з білками цитоскелету аннексинами і полегшує міграцію окисненого фосфатидилсерину з внутрішньої сторони мембранного бішару на зовнішню. По цій причині при індукції апоптозу він з'являється із зовнішньої сторони мембрани [4]. Це використовується для диференціації нормальних життєздатних клітин від тих, у яких виявлена готовність до апоптозу.

При аналізі розподілу клітин в залежності від їх життєздатності встановлено, що через 3 год після ЧМТ досліджувана клітинна популяція характеризувалась невеликою кількістю апоптотичних клітин (табл. 1).

На 1 добу посттравматичного періоду показник AN перевищував норму на 35,4%, сягаючи максимуму на 5 добу спостереження (150,5% порівняно з контролем). Достовірне збільшення показника PI у травмованих тварин виявлено тільки на 5 і 14 добу експерименту – на 46,2 і 30,8% відповідно. Продукція активних форм кисню у нейтрофілах після ЧМТ різко зростає і перевищує показники контролю на 110, 140,1 і 101,6% через 3, 24 год і 5 діб відповідно.

Таблиця 1

Показники апоптозу нейтрофілів та вміст в них активних форм кисню за умов черепно-мозкової травми і цукрового діабету (M±m, n=8)

Показник	Група тварин						
			Час після травми				
	Контроль	ЦД		3 год	24 год	5 діб	14 діб
AN, %	2,97±0,16	3,94±0,21 **	ЧМТ	3,41±0,20	4,02±0,25**	4,47±0,28 ***	3,75±0,30*
			ЧМТ+ЦД	4,53±0,31 ##	5,62±0,37 ^^ ##	7,21±0,50 ^^^###	6,98±0,53 ^^^ ###
PI, %	0,13±0,01	0,21±0,02 **	ЧМТ	0,12±0,01	0,14±0,01	0,19±0,02 *	0,17±0,01*
			ЧМТ+ЦД	0,23±0,02 ###	0,29±0,03 ^###	0,36±0,03 ^^^ ###	0,38±0,04 ^^ ##
АФК, ум.од.	25,38±1,74	43,60±2,95 ***	ЧМТ	53,30±3,26 ***	60,95±4,37 ***	51,17±3,50 ***	29,44±2,08
			ЧМТ+ЦД	107,06±6,81 ^^^###	120,10±6,34 ^^^###	113,52±5,23 ^^^ ###	56,81±3,75 ^ ###

Примітка: статистична значущість змін відносно показників у тварин: 1. * – контрольної групи; 2. # – з черепно-мозковою травмою (ЧМТ); 3. ^ – з цукровим діабетом (ЦД), *#^ – p<0,05; **##^^ – p<0,01; ***###^^^ – p<0,001, AN - рання стадія апоптозу, PI – пізня стадія апоптозу.

У тварин зі стрептозотоцин-індукованим ЦД (табл.1) виявлено вірогідне у порівнянні з контролем збільшення на 32,7% кількості клітин в ділянці, яка відповідає ранній стадії апоптозу (квадрант Q_4), що проявляється в зростанні їх здатності забарвлюватися анексином V-FITC. Кількість нейтрофілів у квадранті Q_2, які є позитивними за PI і анексином V-FITC (пізня стадія апоптозу) зростала на 61,5%. Вказані зміни супроводжувались збільшенням на 71,8% вмісту АФК у нейтрофілах щурів даної експериментальної групи.

Виходячи з наведених в таблиці 1 даних, встановлено статистично вірогідне збільшення кількості нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові, зв'язаних з анексином V, у групі травмованих тварин з гіперглікемією. Так, показник AN перевищував аналогічні значення у II-й експериментальній групі на 32,8, 39,8, 61,3 і 86,1% через 3, 24 год, 5 і 14 діб відповідно. При вивченні вмісту циркулюючих PI позитивних нейтрофілів спостерігалось їх збільшення на 91,7, 107,1, 89,5 і 123,5% порівняно з травмованими тваринами без діабету. Рівень АФК у тварин після ЧМТ на тлі ЦД перевищував значення нормоглікемічних травмованих тварин на 100,9, 97, 121,8 і 93% відповідно до термінів посттравматичного періоду. У тварин II експериментальної групи апоптотичний гомеостаз і рівень АФК в нейтрофілах був практично відновлений на 14 добу посттравматичного періоду на відміну від травмованих щурів з гіперглікемією, в яких фракція клітин, здатних забарвлюватися анексином V та пропідію йодидом, а також вміст вільних кисневих радикалів були статистично вірогідно підвищеними у вказаний термін спостереження.

Очевидно, що саме зафіксоване нами зростання в нейтрофілах вмісту активних форм кисню, яким притаманна пошкоджувальна дія на субклітинні структури, в тому числі і на мембрани мітохондрій і ядра, прискорює процеси апоптозу. Деструкція мітохондріальних мембран під впливом АФК може запускати так званий внутрішній шлях апоптозу. Ключовою подією при цьому є вивільнення певних молекул із міжмембранного простору мітохондрій, зокрема цитхрому с, який в цитоплазмі приєднується до адаптерного білка Apaf, що призводить до його олігомеризації і утворення апоптосоми. Остання активує ініціаторні

прокаспази, в результаті чого формується протеолітичний каскад, який робить апоптоз із певного моменту незворотним процесом.

Проте, не можна виключати, що явища апоптозу, які ми спостерігали у наших есперименах, активувалися також за зовнішнім шляхом. Раніше ми показали, що у тварин з ЧМТ і, особливо, з ЧМТ на фоні супутнього цукрового діабету різко зростає вміст в сироватці прозапального цитокіну ФНП-α [3]. Відомо, що ФНП-α, реагуючи з трансмембранними білками, так званими рецепторами смерті, через адаптерні білки залучає та активує прокаспази, які запускають апоптичний каскад.

Активність нейтрофілів у системі гуморально-клітинної кооперації робить їх чутливим індикатором чисельних порушень гомеостазу. Про це свідчать різноманітні ознаки, які відображають ступінь активації нейтрофілів і їх готовність до реалізації свого ефекторного потенціалу. Реактивні перебудови можуть торкатись і системи апоптозу, тим більше що апоптозна програма нейтрофілів контролюється ендогенними медіаторами [8]. Важлива роль у регуляції апоптозу клітин імунної системи належить цитокінам. При чому один і той же інтерлейкін може бути як індуктором, так і інгібітором апоптозу.

Виявлені вірогідні відмінності у значеннях тварин II і IV-ї експериментальних груп, ймовірно, можна пояснити більш потужною активацією каскаду імунозапальних процесів у травмованих тварин на фоні гіперглікемії. Відомо, що ключову роль у запуску та підтриманні властивих діабету патологічних проявів грає підвищений рівень глюкози в крові. Аутоокислення глюкози, яке супроводжується підвищенням рівня вкрай реакційноздатних вільних радикалів, здійснює запуск ряду реакцій з боку імунної системи, які призводять до порушення процесів ініціації і реалізації програмованої загибелі клітин.

Підсумок

При ЧМТ, цукровому діабеті і, особливо, при ЧМТ на фоні цукрового діабету підвищується інтенсивність апоптозу нейтрофілів крові. Активність апоптичних процесів корелює з вираженістю оксидативного стресу в нейтрофілах.

Перспективи подальших досліджень. *Необхідні фундаментальні дослідження для розкриття механізмів внутрішньоклітинної трансдукції сигналів, що запускають і детермінують апоптоз при ЧМТ і діабеті. Досконале розуміння процесів програмованої загибелі клітин при даних патологіях відкриє нові перспективи для розробки методів їх корекції і профілактики ускладнень.*

Література

1. Губский Ю.И. Роль активных форм кислорода в функциональной активности мар-киназного каскада, глобальных факторов транскрипции и развитии апоптоза / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий [и др.] // - "Журн. АМН України". – 2008. – Т. 14, № 2. - С. 203–217.
2. Ельский В.Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В.Н. Ельский, С.В. Зяблицев // – Донецк: Изд-во «Новый мир»,- 2008. – 140 с.
3. Мерецький В.М. Особливості цитокінового статусу при експериментальній черепно-мозковій травмі на тлі цукрового діабету / В.М. Мерецький, М.М. Корда // - Вісник наукових досліджень. – 2013. - № 1. – С. 96-98.
4. Петрищев Н.Н. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом / Н.Н. Петрищев, Л.В. Васина, А.В. Луговая // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2008. - № 1. – С. 14-23.
5. Пат. 74935 Україна, МПК G 09 B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання черепно-мозкової травми / Мерецький В.М.; заявник і патентовласник Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського. – № u2012 06594; заявл. 30.05.2012; опубл. 12.11.2012, Бюл. № 21.
6. Рєзников О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О.Г.Рєзников // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, №1. – С. 142-145.
7. Стефанова О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / О.В. Стефанов // – К.: Авіцена, - 2001 р. – 528 с.
8. Jagels M.A. Mechanisms and mediators of neutrophilic leukocytosis. / M.A. Jagels, T.E. Hugli // - Immunopharmacology. – 1994. - Vol. 28. – P. 1-18.
9. Lee S.C. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus / S.C. Lee, S. Pervaiz // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2007. – № 39. – P. 497–504.
10. Looney M.R. Neutrophil sandwiches injure the microcirculation / M.R. Looney, M.A. Matthay // Nat. Med. – 2009. – Vol. 15, № 4. – P. 364-366.
11. Li W. Caveolin-1 Inhibits Expression of Antioxidant Enzymes through Direct Interaction with Nuclear Erythroid 2 p45-related Factor-2 (Nrf2) / W. Li, H. Liu, J.S. Zhou [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287, № 25. – P.20922-20930.
12. Maianski N.A. Apoptosis of neutrophils / N.A. Maianski, A.N. Maianski, T.W. Kuijpers [et al.] // Acta Haematol. – 2004. – Vol. 111, № 1-2. – P. 56-66.
13. Rizk N.N.Cerebral ischemia induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats / N.N. Rizk, J.Rafols ,J.C. Dunbar // Brain Res.– 2005. – Vol. 16, № 1053(1-2). – P.1-9.

Реферати

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ОКСИДАТИВНЫМ СТРЕССОМ И ИНТЕНСИВНОСТЬЮ АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Мерецкий В.Н., Корда М.М.

Исследована взаимосвязь между степенью оксидативного стресса в нейтрофилах крови и интенсивностью апоптоза нейтрофилов при экспериментальной черепно-мозговой травме на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. Установлено, что при ЧМТ наблюдается резкий рост продукции активных форм кислорода, увеличение количества аннексин V положительных клеток, которое достигает максимума на 5 сутки наблюдения, и фракции лейкоцитов, положительных по пропидию йодиду, особенно в периоде ранних проявлений после травмы. Сопутствующий сахарный диабет приводит к более выраженному росту явлений апоптоза и свободнорадикального окисления в нейтрофилах. Сделан вывод, что при ЧМТ, сахарном диабете и особенно при ЧМТ на фоне сахарного

RELATIONSHIP BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND NEUTROPHIL APOPTOSIS INTENSITY IN TRAUMATIC CRANIAL INJURY ASSOCIATED WITH DIABETES

Meretskyy V.M., Korda M.M.

Investigated the relationship between the degree of oxidative stress in blood neutrophils and the intensity of neutrophil apoptosis in experimental traumatic cranial injury against streptozotocin-induced diabetes. It is established that trauma is characterized by a sharp increase in production of reactive oxygen species, an increase in the number of annexin V positive cells, which reaches its maximum on the 5th day of observation, and the fraction of white blood cells positive for propidium iodide, especially in the period of the early manifestations of the injury. Concomitant diabetes mellitus leads to a more pronounced increase in the phenomena of apoptosis and free radical oxidation in neutrophils. It is concluded that the head injury, diabetes, and especially when

диабета повышается интенсивность апоптоза нейтрофилов крови. Активность процессов апоптоза коррелирует с выраженностью окислительного стресса в нейтрофилах.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, сахарный диабет, активные формы кислорода, апоптоз нейтрофилов.

Стаття надійшла 30.09.2013 р.

cranial injury and diabetes mellitus increases the intensity of neutrophil apoptosis. The activity of apoptosis correlated with the degree of oxidative stress in neutrophils.

Key words: traumatic cranial injury, diabetes mellitus, reactive oxygen species, neutrophil apoptosis.

Рецензент Непорада К.С.

УДК 612.816: 612.73: 577.164.13/.131

О.В. Романенко, С.С. Шепелєв
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м Київ

ФУНКЦІОНУВАННЯ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОГО СИНАПСУ В УМОВАХ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ ВІТАМІНУ B_1

Вивчали вплив аліментарного дефіциту вітаміну B_1 (тіаміну) на синаптичну передачу в діафрагмальному м'язі миші. В ізольованих френіко-гемідіафрагмальних препаратах, отриманих від тварин, які споживали тіаміндефіцитну дієту, амплітуда мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки (мПКП) та потенціалів кінцевої пластинки (ПКП) на 10-й, 15-й та 20-й дні утримання на дієті та квантовий склад ПКП на 20-й день утримання на дієті були статистично вірогідно меншими, ніж в препаратах, отриманих від тварин контрольної групи та контрольної групи з аліментарним обмеженням. Аліментарний дефіцит тіаміну не обумовлював статистично вірогідних змін частоти мПКП, мембранного потенціалу м'язових волокон та чутливості постсинаптичної мембрани до агоністу нікотинових ацетилхолінових рецепторів карбахолу.

Ключові слова: вітамін B_1, тіамін, нервово-м'язова передача.

Одним з клінічних проявів глибокого дефіциту вітаміну B_1 у людини є периферична полінейропатія. В економічно розвинених країнах глибокий дефіцит зазначеного вітаміну може спостерігатися при зловживанні алкоголем, після тотальної гастректомії, баріатричних операцій, при повному парентеральному харчуванні, перітонеальному діалізі та гемодіалізі, *hyperemesis graviarum*, синдромі набутого імунодефіциту, злоякісних новоутвореннях, зловживанні дієтами, тощо [10]. Морфологічні та функціональні зміни при периферичній полінейропатії, спричиненій дефіцитом вітаміну B_1, описані досить детально [9,10]. Структурні порушення включають зменшення щільності мієлінізованих нервових волокон, аксональну дегенерацію, субперіневральний набряк. Функціональні зміни полягають у суттєвому зниженні амплітуди складних потенціалів дії (ПД) м'язів та ПД чутливих нервів, а також деяке зменшення швидкості проведення імпульсів чутливими та руховими нервами. Разом з тим, процеси, що відбуваються при дефіциті вітаміну B_1 в нервово-м'язових синапсах, довгий час залишалися поза увагою дослідників. З'ясування характеру зазначених процесів є актуальним для розуміння механізмів реалізації біологічної активності вітаміну B_1 і тих порушень, що виникають в організмі при його дефіциті.

Метою роботи було визначення параметрів нервово-м'язової передачі в ізольованих френіко-гемідіафрагмальних препаратах, отриманих від мишей з різною аліментарною забезпеченістю вітаміном B_1.

Матеріал та методи дослідження. Експерименти було проведено на мишах-самцях з початковою масою 10 – 12 г. Роботу з тваринами проводили з дотриманням існуючих біоетичних норм та у відповідності до чинного законодавства [4]. Для запобігання канібалізму та копрофагії кожну тварину розміщували в індивідуальній клітці з сітчастою підлогою. В приміщенні автоматично підтримувалася постійна температура (23 ± 1°C). Тварини були рандомізовано поділені на три експериментальні групи. Тварини I (тіамінконтрольної) групи отримували штучну тіамінконтрольну дієту, яка містила 67,6% вуглеводів, 18% білків, 8% ліпідів, вітаміни (включаючи 16 мг/кг тіаміну гідрохлориду) та мінеральні солі, без обмежень у кількості вжитої дієти. Тварини III (тіаміндефіцитної) групи отримували без обмежень штучну тіаміндефіцитну дієту, ідентичну тіамінконтрольній за складом та способом приготування, але до складу якої не включали тіамін. Тварини II (тіамінконтрольної з аліментарним обмеженням) групи також отримували штучну тіамінконтрольну дієту, однак її добову кількість обмежували, виходячи з кількості їжі, вжитої тваринами III групи на ідентичних термінах утримання. Такий підхід дозволяє диференціювати наслідки власне дефіциту вітаміну B_1 та можливого впливу анорексії, яка виникає на певному етапі розвитку тіаміндефіцитного стану. Контроль за розвитком тіаміндефіцитного стану у тварин здійснювали з використанням неспецифічного методу, який базується на визначенні маси тіла, та специфічного методу, який полягає у визначенні вмісту загального тіаміну в тканинах організму. Для дослідження параметрів нервово-м'язової передачі застосовували стандартну мікроелектродну техніку [3]. Ізольовані френіко-гемідіафрагмальні препарати отримували від тварин I, II та III груп в результаті гострого експерименту на 10-й, 15-й або 20-й день споживання відповідних раціонів. Гемідіафрагму монтували в плексигласовій ванночці об'ємом 7 мл, через яку при кімнатній температурі (20 – 21^0 С) з постійною швидкістю пропускали насичений карбогеном (95% O_2 та 5% CO_2) розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 137,0; KCl – 5,0; $NaHCO_3$ – 11,0; NaH_2PO_4 – 1,0; $CaCl_2$ – 0,5 ммоль/л; $MgCl_2$ – 3,25 ммоль/л; глюкоза – 11,0. М'язові скорочення блокували завдяки використанню згаданого розчину Кребса з низьким вмістом Ca^{2+} (0,5 ммоль/л) та високим вмістом Mg^{2+} (3,25 ммоль/л). З метою стандартизації досліджень таке співвідношення Ca^{2+}/Mg^{2+} було використано в усіх дослідах. Діафрагмальний нерв постійно подразнювали надпороговими прямокутними імпульсами електричного струму тривалістю 0,1 мс з частотою 0,67 $с^{-1}$. За