



О. В. Бесединська,
І. С. Давиденко,
В. І. Бесединський*

Буковинський державний
медичний університет,
м. Чернівці

Обласна комунальна медична
установа «Патологоанатомічне
бюро», м. Чернівці*

© Колектив авторів

ГІСТОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ МІЄЛІНОВИХ ОБОЛОНОК ТА ОСЬОВИХ ЦИЛІНДРІВ ПЕРИФЕРІЙНИХ НЕРВІВ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

Резюме. У статті наведено кількісні результати гістохімічних досліджень обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків мієлінових оболонок та осьових циліндрів великогомілкового нерва при цукровому діабеті. Згідно гістохімічного дослідження в осьових циліндрах та мієлінових оболонках процеси обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків виражені по-різному. Це дозволяє застосовувати отримані дані для вивчення ролі процесів вільнорадикального окиснення білків у розвитку різних патернів нейропатії (аксонопатії та мієлінопатії)

Ключові слова: обмежений протеоліз, окиснювальна модифікація білків, цукровий діабет, мієлінова оболонка, осьовий циліндр.

Вступ

Згідно даних різноманітних літературних джерел розповсюдженість ураження периферійної нервової системи при цукровому діабеті варіює від 15,5 до 47,6 % [4]. Одним із найбільш ранніх проявів діабетичної периферійної полінейропатії можуть бути порушення стану білків мієлінових оболонок та осьових циліндрів. Слід зазначити, що на даний час не вивчено стан білків різних компонентів провідникового апарату периферійних нервів залежно від ступеня ураження. Отримання порівняльних даних є важливим для розуміння патогенезу діабетичної периферійної полінейропатії та вивчення ролі процесів вільнорадикального окиснення білків у розвитку різних патернів нейропатії (аксонопатії та мієлінопатії). В останній час у протеїновому аспекті особливо інтенсивно вивчаються такі процеси як обмежений протеоліз та окиснювальна модифікація білків (ОМБ) [1, 2].

Мета дослідження

Гістохімічним методом встановити кількісні параметри обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків в мієлінових оболонках та осьових циліндрів великогомілкових нервів при цукровому діабеті.

Матеріали та методи досліджень

Матеріалом для даного дослідження стали тканини великогомілкових нервів (ВГН) у хворих на цукровий діабет (ЦД). Аутопсійний матеріал (100) – ділянки ВГН трупів осіб, що загинули від різних причин, у яких в заключному клінічному та патологоанатомічному діагнозах в якості основного чи одного з основних (конкуруючі, поєднані), фонових або супутніх захворювань фігурував цукровий діабет. Забір матеріалу для дослідження проводився не

пізніше, ніж через 6-12 годин після настання біологічної смерті за умов зберігання тіл в холодильній камері. Операційний матеріал (100 спостережень) – взірці тканини ампутованих нижніх кінцівок хворих з діагнозом «стопа діабетика».

Всі досліджені випадки були розділені на дві групи. До першої групи (група А) увійшло 38 спостережень, у яких при проведенні патоморфологічного дослідження не були виявлені структурні зміни нейронального компоненту. Другу групу (групу В) склали 162 спостереження з морфологічними ознаками аксоно- та мієлінопатії. Залежно від ступеня ураження провідникового апарату група В була розділена на три підгрупи. Першу підгрупу (В I) склали 49 спостережень з легким ступенем ураження, другу (В II) – 82 спостереження та третю (В III) – 31 спостереження відповідно з середнім та тяжким ступенем ураження.

Контрольну групу склали 20 трупів осіб, що померли від причин, що не пов'язані з цукровим діабетом.

Шматочки великогомілкових нервів фіксували 24-48 годин у нейтральному забуференому за Ліллі 10 % розчині формаліну, після зневоднювання матеріал заливали у парафін-віск. Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки фарбували за допомогою двох гістохімічних методик. Перша методика – нінгідринно-шифовська реакція на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikawa, яка дозволяє оцінити ступінь обмеженого протеолізу, внаслідок якого частково «відкриваються» приховані аміногрупи білків. Кількісною мірою обмеженого протеолізу служила величина оптичної густини у відносних одиницях оптичної густини (від 0 – відсутність забарвлення, абсолютна прозорість, до 1 – максимальне забарвлення, абсолютна непрозорість), яку вимірювали

на цифрових монохромних копіях зображення шляхом комп'ютерної мікроденситометрії [3] за допомогою комп'ютерної програми GIMP (ліцензія GPL, 2012, версія 2,80). Друга методика – фарбування на «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім за Мікель-Кальво. Згідно з методикою [1], з гістологічних зрізів за стандартних умов освітлення в прохідному світлі робили цифрові копії оптичних зображень. З метою об'єктивної оцінки кольору зображення за допомогою комп'ютерної програми GIMP (ліцензія GPL, 2012) зондовим методом виконували комп'ютерну мікроспектрофотометрію у системі оцінки кольору RGB (Red, Green, Blue) [1]. У результаті отримували два параметри R та B, на основі яких отримували коефіцієнт R/B, який використовувався як міра ОМБ.

Обраховували середню арифметичну та її похибку. Порівняння між групами дослідження робили за допомогою двох методів – параметричний двосторонній непарний критерій Стьюдента та непараметричний критерій Mann-Whitney у середовищі комп'ютерної програми PAST (вільна ліцензія) [5]. Попередньо виконували перевірку на нормальність у вибірках методом Shapiro-Wilki за допомогою комп'ютерної програми PAST. Виконували також регресійний аналіз для встановлення форми зв'язку. Назви груп дослідження та величина кожної статистичної вибірки вказані у таблиці.

Результати досліджень та їх обговорення

Рисунки з мікрофотографіями гістологічних зображень дають уяву про те, як профарбовуються структури нейтрального компоненту периферійного нерву при використаних гістохімічних методиках (рис. 1, 2).

При аналізі цифрових даних виявлено, що у 8 випадках групи А (структурні зміни нейронального компоненту відсутні) коефіцієнт R/B в осьових циліндрах становив $1,09 \pm 0,015$ (у контролі – $1,07 \pm 0,008$) та $1,08 \pm 0,0121$ (у контролі – $1,06 \pm 0,010$) – у мієлінових оболонках. Розбіжності між групами контролю та гру-

пою дослідження невірогідні ($p > 0,05$). В інших 30 випадках цієї ж групи коефіцієнт R/B склав $1,41 \pm 0,013$ в осьових циліндрах та $1,25 \pm 0,014$ у мієлінових оболонках ($p < 0,01$). Аналогічна тенденція прослідковується при аналізі середніх величин оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava. Це дало підставу розділити групу А на дві підгрупи.

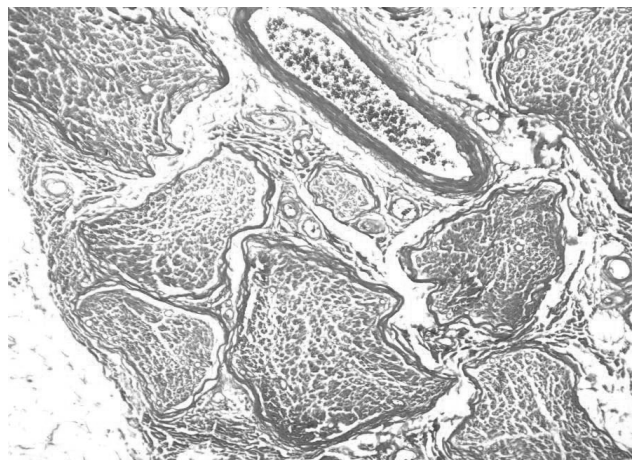


Рис. 1. Мікрофотографія структурних компонентів периферійного нерву. Нінгідриново-шифововська реакція на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava. Об. 20^x, Ок. 10^x

У другій групі дослідження коефіцієнт R/B та середні величини оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava в осьових циліндрах та мієлінових оболонках при легкому, середньому та тяжкому ураженні провідникового апарату за середніми тенденціями відрізнявся від групи контролю. Регресійний аналіз по ступенях ураження показав, що у більшості випадків інтенсивність ОМБ та обмеженого протеолізу в провідниковому апараті має лінійний характер зростання відповідно до тяжкості ураження ($p < 0,01$).

При порівнянні цифрових даних вказаних у таблиці, видно, що в осьових циліндрах та мієлінових оболонках зміни властивостей біл-

Таблиця

Кількісні показники властивостей білків осьових циліндрів та мієлінових оболонок великогомілкового нерву при цукровому діабеті та в групі контролю ($X \pm Sx$)

Групи дослідження	Показники			
	Оптична густина специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava (в. од. опт. густини). Комп'ютерна мікроденситометрія		Коефіцієнт R/B при специфічному забарвленні на кислі та основні білки за Мікель-Кальво. Комп'ютерна мікроспектрофотометрія	
	Осьові циліндри	Мієлінові оболонки	Осьові циліндри	Мієлінові оболонки
Контрольна група (n=20)	0,197±0,0013	0,195±0,0011	1,07±0,008	1,06±0,010
Група А I (n=8)	0,198±0,0012, P>0,05	0,194±0,0013, P>0,05	1,09±0,015, P>0,05	1,08±0,012, P>0,05
Група А II (n=30)	0,202±0,0015, P=0,002	0,198±0,0016, P<0,01	1,41±0,013, P=0,001	1,25±0,014, P<0,01
Група В I (n=49)	0,208±0,0014, P<0,01	0,204±0,0010, P=0,003	1,67±0,011, P<0,01	1,44±0,011, P=0,003
Група В II (n=82)	0,219±0,0011, P=0,003	0,212±0,0013, P<0,01	1,97±0,014, P<0,01	1,89±0,012, P<0,01
Група В III (n=31)	0,225±0,0012, P<0,01	0,218±0,0011, P=0,002	2,15±0,016, P=0,002	1,98±0,016, P=0,01



ків у середніх тенденціях проявляються не однаково.

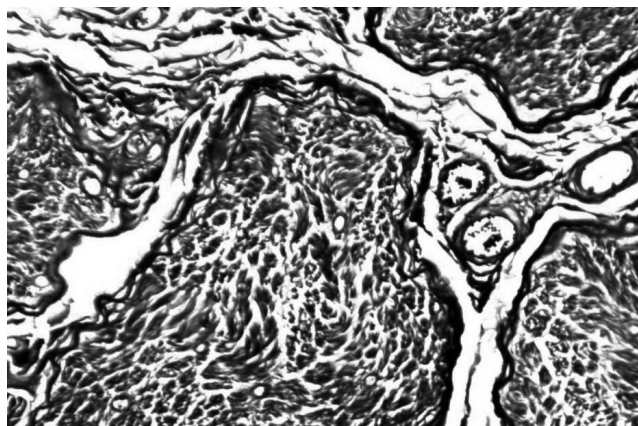


Рис. 2. Мікрофотографія структурних компонентів периферійного нерву. Забарвлення на «кислі» та «основні» білки бромфеноловим синім за Мікель-Кальво. Об. 40^x, Ок. 10^x

Так, у осьових циліндрах, згідно середніх величин оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava, обмежений протеоліз зростає більш інтенсивно у порівнянні з мієліновими оболонками. Аналогічна тенденція прослідковується при дослідженні коефіцієнту R/V при специфічному забарвленні на кислі та основні білки за Мікель-Кальво. Інтенсивність процесів ОМБ найбільш інтенсивно виражені в осьових циліндрах.

Висновки

1. Наведений аналіз змін показників дозволяє констатувати, що в осьових циліндрах та мієлінових оболонках великогомілкових нервів хворих на цукровий діабет посилюються процеси вільнорадикального окиснення білків з характерними ефектами – окиснення аміногруп білків та зростання обмеженого протеолізу.

2. Інтенсивність окиснювальної модифікації білків та обмеженого протеолізу у структурах провідникового апарату великогомілкових нервів при цукровому діабеті має лінійний характер зростання відповідно до ступеня ураження згідно до коефіцієнта R/V та оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків.

3. Згідно гістохімічного дослідження в осьових циліндрах та мієлінових оболонках процеси обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків виражені по-різному. Це дозволяє застосовувати отримані дані для вивчення ролі процесів вільнорадикального окиснення білків у розвитку різних патернів нейропатії (аксонопатії та мієлінопатії).

Перспектива подальших досліджень полягає у вивченні кількісних характеристик обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків в ендотелії судин гемомікроциркуляторного русла великогомілкових нервів при цукровому діабеті.

ЛІТЕРАТУРА

1. Давиденко І. С. Заходи стандартизації гістохімічної методики на окиснювальну модифікацію білків / І. С. Давиденко // Український медичний альманах. – 2013. – № 3 (додаток). – С. 180–181.

2. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е. Е. Дубинина, А. В. Пустыгина // Український біохімічний журнал. – 2008. – № 6. – С. 5-18.

3. Пішак В. П. Комп'ютерно-денситометричні та спектральні параметри білкового компонента трофобласта, децидуоцитів, материнських і плодкових еритроцитів

плаценти при експериментальній гіпохромній анемії вагітних / В. П. Пішак, І. С. Давиденко, Ю. Є. Роговий // Одеський мед. журнал. – 2003. – №6. – С. 26-29.

4. Сергієнко О. О. Діабетичні нейропатії: сучасний погляд на проблему, огляд літератури та власних досліджень / О. О. Сергієнко, А. С. Єфімов // Журнал АМН України. – 2002. – №3. – С. 487-507.

5. Hammer O. PAST: Paleontological Statistics. Reference Manual. / O. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // Oslo: University of Oslo. – 2012, – 284 p.



ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА БЕЛКОВ
МИЕЛИНОВЫХ ОБОЛОЧЕК
И ОСЕВЫХ ЦИЛИНДРОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

*Е. В. Бесединская,
И. С. Давыденко,
В. И. Бесединский*

Резюме. Авторы приводят результаты собственных гистохимических исследований ограниченного протеолиза и окислительной модификации белков в миелиновых оболочках и аксонах периферических нервов при сахарном диабете. Согласно гистохимическому исследованию в осевых цилиндрах и миелиновых оболочках процессы ограниченного протеолиза и окислительной модификации белков выражены по-разному. Это позволяет использовать полученные данные для изучения роли процессов свободнорадикального окисления белков в развитии разных паттернов нейропатии (аксонопатии и миелинопатии).

Ключевые слова: *ограниченный протеолиз, окислительная модификация белков, сахарный диабет, миелиновая оболочка, осевой цилиндр.*

HISTOCHEMICAL
PROPERTIES OF PROTEINS
OF MYELIN SHEATHS AND
AXONS OF PERIPHERAL
NERVES IN DIABETES
MELLITUS

*O. V. Besedinska,
I. S. Davydenko,
V. I. Besedinskyi*

Summary. Authors give quantitative results of their own histochemical investigations of limited proteolysis and oxidative modification of axon and myelin proteins in the case of the diabetes mellitus. An unequal level of the limited proteolysis and oxidative modification of proteins in axons and myelin has been demonstrated. The use of this method for study of the role of free radical oxidation of proteins in the development of different neuropathy patterns (axonopathy and myelinopathy) is reasonable.

Key words: *limited proteolysis, oxidative modification of proteins, diabetes mellitus, axon, myelin.*