

УДК 616.379-008.64

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

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці*
Обласна комунальна медична установа
«Патологоанатомічне бюро»,
м. Чернівці**

ГІСТОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ СУДИН МІКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ПЕРИФЕРІЙНИХ НЕРВІВ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

Ключові слова: обмежений протеоліз, окиснювальна модифікація білків, цукровий діабет, мікроциркуляторне русло, периферійний нерв.

Резюме. У статті розглядаються кількісні результати гістохімічних досліджень обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків ендотеліоцитів різних ланок мікроциркуляторного русла великогомілкового нерва при цукровому діабеті.

Вступ

Згідно даних різноманітних джерел літератури розповсюдженість ураження периферійної нервової системи при цукровому діабеті (ЦД) коливається від 15,5 до 47,6% [7]. Патогенез таких ускладнень є мультифакторним та поєднує в собі метаболічні та судинні чинники. Останні пов'язані з розвитком діабетичної мікроангіопатії (ДМА) судин мікроциркуляторного русла (МЦР) системи *vasa nervorum*. Однією з найважливіших ланок патогенезу мікроангіопатії є пошкодження судинного ендотелію [1], що пов'язано з посиленням процесів вільнорадикального окиснення білків ендотеліоцитів. На даний час актуальним є дослідження стану білків ендотеліоцитів різних елементів МЦР периферійних нервів, залежно від ступеня ураження. Отримання порівняльних даних є важливим для розуміння патогенезу периферійної полінейропатії та вивченні ролі процесів вільнорадикального окиснення білків у розвитку ендотеліальної дисфункції судин МЦР периферійних нервів при цукровому діабеті. В останній час у протеїновому аспекті особливо інтенсивно вивчаються обмежений протеоліз та окиснювальна модифікація білків (ОМБ) [2].

Мета дослідження

Гістохімічним методом встановити кількісні характеристики обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків ендотеліоцитів різних ланок мікроциркуляторного русла великогомілкових нервів при цукровому діабеті.

Матеріал і методи

Матеріалом для даного дослідження стали тканини великогомілкових нервів (ВГН) у хворих на цукровий діабет (ЦД). Автопсійний матеріал (100) – ділянки ВГН, трупів осіб, що загинули від різних причин, в яких у заключному клінічному

та патологоанатомічному діагнозах як основне чи одне з основних (конкуруючі, поєднані), фонових або супутніх захворювань фігурував ЦД. Забір матеріалу для дослідження проводився не пізніше, ніж через 6-12 годин після настання біологічної смерті в умовах зберігання тіл у холодильній камері. Операційний матеріал (100) – тканини ампутованих нижніх кінцівок хворих із діагнозом «стопа діабетика».

Залежно від ступеня ураження гемомікросудин периферійних нервів всі досліджені випадки були розподілені на п'ять груп. До першої групи увійшло 8 випадків (4%), в яких при проведенні патоморфологічного дослідження не були виявлені структури зміни судинного компоненту. Другу групу склали 30 випадків (15%) із початковими проявами ДМА, третю - 49 хворих (24,5%) з ознаками помірної ДМА, четверту - 82 випадки (41%) з помірною ДМА та п'яту - 31 випадок (15,5%) із вираженою ДМА.

Контрольну групу склали 20 трупів осіб, що померли від причин, не пов'язаних із ЦД.

Шматочки ВГН фіксували 24-48 годин у нейтральному забуференому за Ліллі 10%-му розчині формаліну, після зневоднювання матеріал заливали у парафін-віск. Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки фарбували за допомогою двох гістохімічних методик. Перша методика – нінгідриново-шифововська реакція на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava, яка дозволяє оцінити ступінь обмеженого протеолізу, унаслідок чого «відкриваються» приховані аміногрупи білків. Кількісною мірою обмеженого протеолізу слугувала величина оптичної густини в 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 [5] за

допомогою комп'ютерної програми GIMP (ліцензія GPL, 2012). Друга методика - на «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім за Мікель-Кальво. З гістологічних зрізів за стандартних умов освітлення в прохідному світлі робили цифрові копії 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) [2]. У результаті отримували два параметри R та B, на основі яких отримували коефіцієнт R/B, який використовувався як міра ОМБ. Обраховували середню арифме-

тичну та її похибку. Порівняння між групами дослідження робили за допомогою двох методів – параметричний двосторонній непарний критерій Стьюдента та непараметричний критерій Манн-Уїтні в середовищі комп'ютерної програми PAST (вільна ліцензія) [8]. Попередньо виконували перевірку на нормальність у вибірках методом Шапіро-Уїлкі за допомогою комп'ютерної програми PAST. Назви груп дослідження та величина кожної статистичної вибірки вказані в таблицях 1 і 2.

Обговорення результатів дослідження

Рисунки з мікрофотографіями гістологічних зображень дають уявлення про те, як профарбо-

Таблиця 1

Кількісні показники оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikawa ендотеліоцитів судин мікроциркуляторного русла великогомілкових нервів при цукровому діабеті та в групі контролю ($X \pm Sx$), од.опт.густини. Комп'ютерна мікроденситометрія

Групи дослідження	Показники				
	Артеріола	Прекапілярна артеріола	Капіляр	Посткапілярна венула	Венула
Контрольна група (n=20)	0,196±0,0013	0,197±0,0012	0,198±0,0011	0,194±0,0013	0,196±0,0011
ДМА відсутня (n=8)	0,201±0,0012 P=0,002	0,203±0,0015 P<0,01	0,205±0,0014 P=0,003	0,201±0,0014 P<0,01	0,204±0,0014 P<0,01
Початкова ДМА (n=30)	0,207±0,0011 P<0,01	0,208±0,0014 P=0,003	0,209±0,0010 P=0,002	0,208±0,0015 P<0,01	0,209±0,0016 P<0,01
Незначна ДМА (n=49)	0,214±0,0011 P=0,004	0,215±0,0013 P<0,01	0,213±0,0012 P<0,01	0,216±0,0014 P=0,003	0,213±0,0012 P<0,01
Помірна ДМА (n=82)	0,221±0,0012 P<0,01	0,219±0,0013 P=0,006	0,222±0,0014 P<0,01	0,220±0,0010 P<0,01	0,221±0,0013 P=0,003
Виражена ДМА (n=31)	0,229±0,0013 P<0,01	0,228±0,0012 P=0,005	0,229±0,0015 P<0,01	0,227±0,0011 P=0,002	0,228±0,0014 P=0,004

Таблиця 2

Коефіцієнт R/B при специфічному забарвленні на кислі та основні білки за Мікель-Кальво ендотеліоцитів судин мікроциркуляторного русла великогомілкових нервів при цукровому діабеті та в групі контролю ($X \pm Sx$). Комп'ютерна мікроденситометрія

Групи дослідження	Показники				
	Артеріола	Прекапілярна артеріола	Капіляр	Посткапілярна венула	Венула
Контрольна група (n=20)	1,09±0,008	1,06±0,007	1,08±0,004	1,05±0,005	1,07±0,003
ДМА відсутня (n=8)	1,25±0,002 P<0,01	1,23±0,006 P=0,003	1,19±0,002 P<0,01	1,21±0,004 P<0,01	1,24±0,007 P=0,006
Початкова ДМА (n=30)	1,42±0,004 P<0,01	1,45±0,003 P<0,01	1,39±0,002 P=0,004	1,41±0,002 P=0,002	1,43±0,004 P<0,01
Незначна ДМА (n=49)	1,65±0,007 P=0,003	1,60±0,002 P<0,01	1,62±0,006 P<0,01	1,64±0,004 P<0,01	1,66±0,003 P=0,006
Помірна ДМА (n=82)	1,87±0,002 P=0,002	1,91±0,003 P<0,01	1,88±0,005 P=0,004	1,94±0,004 P=0,005	1,92±0,005 P<0,01
Виражена ДМА (n=31)	2,10±0,003 P=0,003	2,03±0,004 P<0,01	2,08±0,006 P=0,004	2,05±0,007 P<0,01	2,06±0,002 P=0,003

вуються структурні компоненти МЦР периферійного нерву при використаних гістохімічних методах.

Результати статистичних обрахунків наведені в таблиці 1 і 2.

Дослідження коефіцієнт R/B та середні величини оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava в ендотеліоцитах різних ланок МЦР при початковій, незначній, помірній, вираженій ДМА та у хворих на ЦД без ознак ДМА (перша група дослідження) за середніми тенденціями відрізнявся від групи контролю. Регресійний аналіз по ступенях ураження показав, що у більшості випадків інтенсивність ОМБ та обмеженого протеолізу в ендотеліоцитах МЦР має лінійний характер зростання відповідно до тяжкості ураження ($p < 0,01$).

При порівнянні цифрових даних вказаних у таблиці 1 і 2 видно, що в ендотеліоцитах різних ланок МЦР зміни властивостей білків у середніх тенденціях перебігають практично однаково. Так, при порівнянні коефіцієнта R/B (специфічне забарвлення на кислі та основні білки за Мікель-Кальво) в ендотеліоцитах артеріол, прекапілярних артеріол, капілярів, посткапілярних венул та венул однієї групи дослідження різниця є невірогідна ($p > 0,05$). Аналогічна тенденція прослідковується при аналізі середніх величин оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava.

Висновки

1. Наведений аналіз змін показників дозволяє констатувати, що в ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла великогомілкових нервів хворих на цукровий діабет посилюються процеси вільнорадикального окиснення білків із характерними ефектами – зростання протеолізу й окиснення аміно- та сульфгідрильних груп білків.

2. Інтенсивність окиснювальної модифікації білків та обмеженого протеолізу в ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла великогомілкових нервів при цукровому діабеті має лінійний характер зростання відповідно до ступеня ураження згідно до коефіцієнта R/B та оптичної густини специфічного забарвлення на вільні аміногрупи білків.

3. Згідно гістохімічного дослідження процеси обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків в ендотеліоцитах різних структурних елементів мікроциркуляторного рула (артеріол, прекапілярних артеріол, капілярів, посткапілярних венул та вену) виражені однаково.

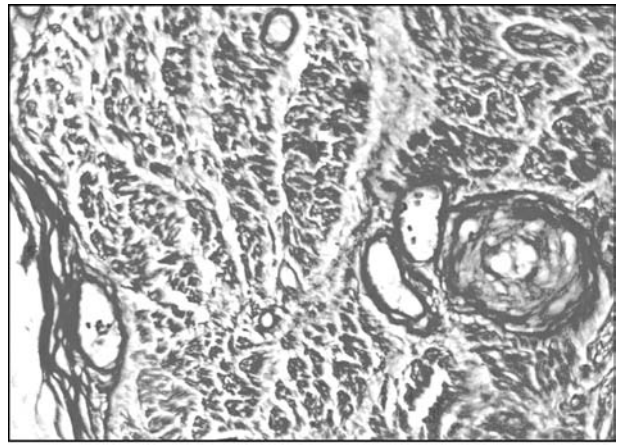


Рис. 1. Мікрофотографія структурних компонентів периферійного нерва. Нінгідриново-шифовська реакція на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava. Об.40^x, Ок.10^x

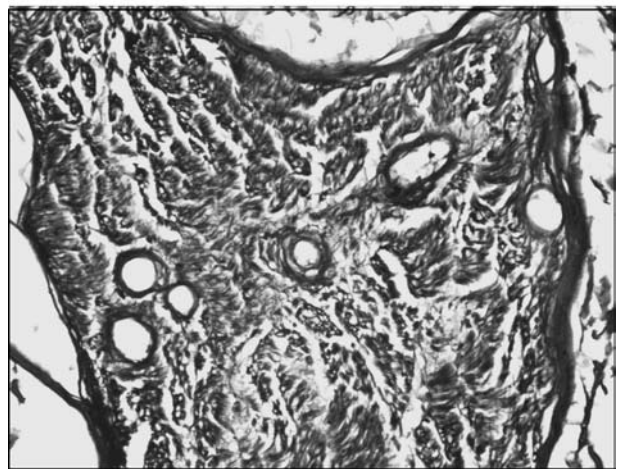


Рис. 2. Мікрофотографія структурних компонентів периферійного нерва. Забарвлення на «кислі» та «основні» білки бромфеноловим синім за Мікель-Кальво. Об.20^x, Ок.10^x

Перспектива подальших досліджень

Перспектива подальших досліджень полягає у визначенні конкретних величин діагностичної цінності показників обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків в ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла периферійних нервів при різних стадіях діабетичної мікроангіопатії.

Література. 1. Волосовец О.П. Сучасні погляди на проблеми дисфункції ендотелію та можливості її корекції засобами антигомотоксичної терапії / О.П.Волосовец, С.П.Кривоустов, Т.С.Остапчук // Практична ангіол. – 2005. – №1(01). – С.26-30. 2. Давиденко І.С. Заходи стандартизації гістохімічної методики на окиснювальну модифікацію білків / І.С. Давиденко // Український медичний альманах. – 2013. – № 3 (додаток). – С. 180 – 181. 3. Дедов І.І. Дисфункція ендотелію в розвитку судинистих ускладнень сахарного діабета / І.І.Дедов, М.В.Шестакова, Т.В.Кочемасова // Пробл. ендокринології. – 2002. – № 4. – С. 21-24. 4. Дубинина Е.Е. Окислителная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохімічний ж. – 2008. – № 6. – С.5-18. 5. Пішак В.П. Комп'ютерно-денситометричні та спектральні параметри білкового компонента трофобласта, децидуо-

цитів, материнських і плодових еритроцитів плаценти при експериментальній гіпохромній анемії вагітних / В.П.Пішак, І.С.Давиденко, Ю.С.Роговий // Одеський мед. ж. - 2003. - №6. - С.26-29. 6.Салтыков Б.Б. Диабетическая микроангиопатия / Б.Б. Салтыков, В.С. Пауков. - М.: Медицина, 2002. - 240с. 7.Сергієнко О.О. Диабетичні нейропатії: сучасний погляд на проблему, огляд літератури та власних досліджень / О.О. Сергієнко, А.С. Єфімов // Журнал Академії медичних наук України. - 2002.- №3.- С. 487-507. 8. Hammer O. PAST: Paleontological Statistics. Reference Manual. / O.Hammer, D.A.T.Harper, P.D. Ryan // Oslo: University of Oslo. - 2012– 284 p. 9. Shin J.Oh. Color Atlas of Nerve Biopsy Pathology / J.Oh. Shin. – London: CRC Press LLC, 2002. – 272p.

**НЕКОТОРЫЕ ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
БЕЛКОВ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ СОСУДОВ
МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА
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 эндотелиоцитах сосудов микроциркуляторного русла периферических нервов при сахарном диабете.

Ключевые слова: ограниченный протеолиз, окислительная модификация белков, сахарный диабет, микроциркуляторное русло, периферический нерв.

**SOME HISTOCHEMICAL PROPERTIES OF THE
ENDOTHELIAL CELL PROTEINS OF THE
PERIPHERAL NERVE MICROCIRCULATORY
BLOODSTREAM IN CASE OF DIABETES MELLITUS**

O.V.Besedinska, I.S. Davydenko, V.I.Besedinsky

Abstract. In the article the authors consider their own quantitative results of histochemical investigations of limited proteolysis and proteins oxidative modifications of endotheliocytes in different sections of the tibial nerve microcirculatory bloodstream in case of diabetes mellitus.

Key words: limited proteolysis, oxidative modification of proteins, diabetes mellitus, peripheral nerve, haemocirculatory blood stream.

Bukovyna State Medical University (Chernivtsi)

RCMB «Pathoanatomical Bureau» (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol.- 2013.- Vol.12, №4 (46).-P.31-34.

Надійшла до редакції 01.12.2013

Рецензент – проф. В.Т.Бачинський

© О.В.Бесединська, І.С.Давиденко, В.І.Бесединський, 2013