УДК 617.713-001-06:616-091.8-02:612.014.464]-092.9

© М. В. ТУРЧИН

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"

Роль активних форм кисню у процесах ініціації апоптичної загибелі клітин за умови механічної непроникаючої травми рогівки в експерименті

M. V. TURCHYN

SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky"

ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE PROCESS INITIATION OF APOPTOTIC CELL DEATH BY MECHANICAL NONPENETRATING CORNEAL INJURY IN EXPERIMENT

В експериментах на кролях доведено, що при експериментальній непроникаючій механічній травмі рогівки достовірно зростають рівні активних форм кисню та спонтанного апоптозу ядровмісних клітин крові протягом 21 доби спостереження з максимумами на 3-й і 14-й дні. При цьому встановлено, що одним із шляхів ініціації програмованої загибелі клітин крові шляхом апоптозу при модельованій травмі є мітохондрійопосередкований.

It was proved that significantly increases of the level of reactive oxygenspecies and spontaneous apoptosis of blood cells within 21 days of observation with maximum at the 3rd and 14th days in the case of experimental nonpenetrative mechanical corneal injury. It was found that mitochondria mediated way is one of the ways which initiate programmed cell death by apoptosis in blood during experimental trauma.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Травми ока є поширеною причиною порушення зору і сліпоти у всьому світі зі значними соціально-економічними наслідками [11, 13]. Згідно з даними Т. А. Красновида, соціально-економічна значущість цієї проблеми зростає у зв'язку з тим, що основним контингентом хворих із травматичними пошкодженнями ока є переважно чоловіки молодого, найбільш працездатного віку [1]. Близько півмільйона людей у світі сліпоту, а 30–40 % – монокулярний зір пов'язують із механічною травмою ока [7, 12]. Щорічно близько 2 млн випадків травм очей реєструються у Сполучених Штатах Америки, у результаті чого 40 тисяч пацієнтів мають постійне порушення зору [10]. Дослідниками вивчено поширеність очної травми не тільки у США, але й у Великобританії, Швеції, Греції, Росії та інших країнах, проте у доступній літературі ми не знайшли статистичних даних щодо поширеності непроникаючої механічної травми ока в Україні [8]. З патофізіологічної точки зору, така висока захворюваність на травми очей створює необхідність дослідження механізмів розвитку і прогресування захворювання для розробки ефективних методів консервативного та хірургічного лікування.

Відомо, що розвиток багатьох захворювань очей, зокрема катаракти, глаукоми, дегенерації сітківки, пов'язаний з утворенням мітохондріями активних форм кисню [3]. Рівень активних форм кисню (АФК) в клітинах крові є важливою характеристикою їх метаболічного стану. Його зміна виступає сигнальним механізмом для запуску різних клітинних процесів, у тому числі й апоптозу.

Мета роботи: з'ясувати роль активних форм кисню в крові експериментальних тварин в ініціації апоптичної загибелі клітин крові при експериментальній механічній непроникаючій травмі рогівки.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження проводили на статевозрілих кролях породи "Шиншила" масою від 2,5 до 3,0 кг відповідно до Женевської конвенції "International Guiding principles for Biochemical research in volving animals" (Geneva, 1990) та згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001). Кролі отримували повноцінне збалансоване харчування і перебували в належних санітарно-гігієнічних умовах віварію ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України".

Експериментальну модель пошкодження рогівки відтворювали на обох очах тварини під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином ал-

каїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну 1,0 мл. Трепаном діаметром 7 мм у верхній половині рогівки наносили концентричну епітеліальну насічку, в межах якої одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій разом з переднім шаром строми рогівки (викроювали клапоть товщиною до 0,2 мм). Контроль відтворення ерозії здійснювали методом фарбування рогівки 0,5 % розчином флюоресцеїну.

Тварин поділили на п'ять груп: контрольна група – інтактні тварини (10 кролів); перша дослідна група – термін спостереження через 3 доби після травми (10 кролів); друга дослідна група – через 7 днів після травми (10 кролів); третя дослідна група – через 14 днів після травми (10 кролів); четверта дослідна група – термін спостереження через 21 день після травми (10 кролів).

В умовах тіопентало-натрієвого знеболювання (25 мг/кг) у кролів з крайової вени вуха забирали кров, після чого виводили з експерименту методом повітряної емболії. Ядровмісні клітини крові (ЯКК) виділяли методом седиментації в 3 % поліглюкіні, оскільки вченими з Інституту кріобіології і кріомедицини НАН України встановлено, що використання даного методу виділення достовірно не змінює рівень АФК від фізіологічних значень [5].

Аналіз зразків клітин крові проводили на проточному цитометрі EpicsXL ("BeckmanCoulter", США) за допомогою гістограм та відповідних їм вікон статистики, що містили показники середньої геометричної інтенсивності світіння мічених клітин. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках (інтенсивність світіння на клітину). Барвник дихлорфлюоресцеїну діацетат (ДХФ-ДА) є неполярною сполукою, пасивно проникаючи в клітину, гідролізується естеразами, перетворюючись у полярну сполуку, не здатну дифундувати назад з клітини – 2,7-дигідродихлорфлюоресцеїн. У присутності внутрішньоклітинних АФК, 2,7-дигідродихлорфлюоресцеїн окиснюється до 2,7-дихлорфлюоресцеїну, який є флуоресціюючою сполукою у ділянці зеленого спектра, що дозволяє аналізувати клітини за інтенсивністю світіння барвника (FL-1 канал) за допомогою проточної цитометрії [9].

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTICA. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою критерію Манна–Уїтні.

Кореляційний аналіз проводили між усіма досліджуваними показниками. Вираховували коефіцієнт лінійної кореляції (r) та його достовірність (p), що відповідним чином позначалося у таблицях (кореляційних матрицях). Якщо показник r=0, зв'язок вважався відсутнім, у діапазоні 0–0,3 – свідчив про слабку кореляцію, проміжок показника 0,3–0,7 характеризував зв'язок середньої сили, а інтервал 0,7–1,0 вказував на значну кореляційну взаємодію. Коефіцієнт кореляції оцінювали як достовірний при $p<0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Проведене нами дослідження вказало на те, що у дослідній групі 1 в плазмі крові експериментальних тварин спостерігали достовірне зростання рівня АФК ядровмісних клітин на 88,45 % порівняно з даними контролю, причому такий високий рівень кисневих радикалів відмічено протягом 21 доби спостереження ($p<0,05$) (табл. 1). Так, у 2-й дослідній групі відсоток АФК зріс на 83,55 % порівняно з нормою, проте був майже однаковий з даними попередньої групи, тоді як уже в 3-й групі кисневі радикали підвищилися на 74,9 % відносно отриманих результатів 2-ї групи. Через 20 діб після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки рівень АФК достовірно зріс у 3,25 раза стосовно даних контрольної групи ($p<0,05$), проте не відмічено динамічних змін відносно 14-ї доби.

Таблиця 1. Показники активних форм кисню та спонтанного апоптозу ядровмісних клітин крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки (M±m)

Показник	Контрольна група (n=10)	Дослідна група 1 (n=10)	Дослідна група 2 (n=10)	Дослідна група 3 (n=10)	Дослідна група 4 (n=10)
АФК, %	22,07±0,90	41,59±0,72 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	40,51±1,18 $p_1<0,05$ $p_2>0,05$	70,86±1,44 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	71,62±1,06 $p_1<0,05$ $p_2>0,05$
Спонтанний апоптоз, %	2,50±0,28	3,99±0,25 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	4,60±0,22 $p_1<0,05$ $p_2>0,05$	6,26±0,25 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	6,72±0,24 $p_1<0,05$ $p_2>0,05$

Примітка. p_1 – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами; p_2 – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

Відомо, що у фізіологічно повноцінній клітині АФК утворюються постійно у невеликій кількості, які клітина інактивує за допомогою антиоксидантної системи. Тому ці кисневі радикали не викликають пошкодження клітини. За умови досліджуваної нами експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки АФК клітин крові перевищують захисні можливості клітини, що, за даними літератури, викликає порушення цілісності мітохондрій, виснаження АТФ і активацію ферментів лізосом, а це призводить до руйнування клітини [2]. Результати нашого дослідження показали сповільнення утворення АФК на 7-му і 21-шу доби, що може бути пов'язано як з активацією ферментів антиоксидантного захисту (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза), в результаті чого процес утворення АФК у клітині сповільнюється, так і з порушенням естеразної ензиматичної активності всередині клітини. Крім того, можливе збільшення швидкості рециклінгу NADPH/NADP за участю NADP-оксидази у даних експериментальних умовах, що знижує цитозольну концентрацію АФК [6].

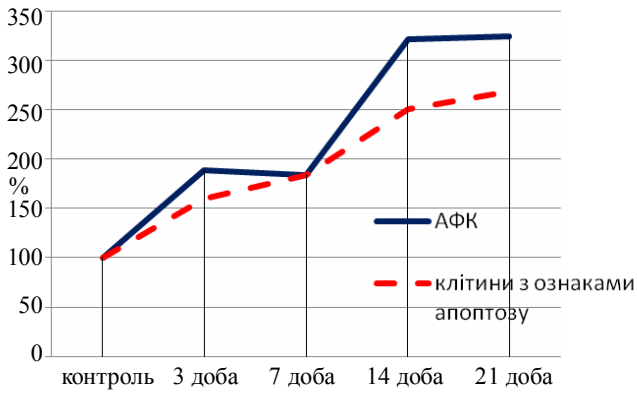

Рис. 1. Динаміка рівня вільних радикалів та апоптичної загибелі клітин крові за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки.

Наступним етапом було дослідження спонтанного апоптозу ядровмісних клітин крові при механічній травмі рогівки. Встановлено, що відсоток клітин з ознаками апоптичної загибелі хвилеподібно зростав протягом 20 діб спостереження. Так, у дослідній групі 1 відсоток клітин з явищами апоптозу зріс в 1,59 раза, у групі 2 – в 1,84 раза, у групі 3 – у 2,50 раза і в групі 4 – у 2,68 раза стосовно контролю (табл. 1). Порівнюючи динаміку досліджуваних параметрів, слід відмітити односпрямовані їх зміни з максимумами на 3-тю і 14-ту доби (рис. 1). Аналізуючи отримані зміни, можна говорити про значний вклад оксидаційного стресу в апоптичну загибель клітин.

Окисне ураження є результатом оксидаційного стресу, коли порушується баланс прооксидантно-антиоксидантної системи. У попередніх дослідженнях доведено, що за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки відмічається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення: підвищення рівнів ТБК-активних продуктів і шифових основ у крові та водянистій волозі з максимальним зростанням на 14-ту добу ($p<0,05$). Враховуючи, що одним із проявів токсичної дії метаболітів кисню є інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, що проявляється зростанням рівня малонового діальдегіду, ми провели зіставлення отриманих результатів ТБК-реактантів з АФК і встановили значну кореляційну взаємодію між цими показниками (табл. 2). Звертає на себе увагу те, що найміцніші зв'язки між показником раннього апоптозу та показниками продуктів тіобарбітурової кислоти і АФК були протягом 7–14 діб спостереження. Це підтверджує, що у цей період апоптичні зміни ядровмісних клітин запускають вільнорадикальні процеси, які значно активуються.

Таблиця 2. Кореляційні зв'язки між показником раннього апоптозу, ТБК-реактантами та рівнем АФК ядровмісних клітин крові при експериментальній непроникаючій механічній травмі рогівки

Пари кореляційних зв'язків		Дослідні групи	Коефіцієнт кореляції, r_{xy}	Вірогідність кореляційного зв'язку, p
Рівень ТБК-реактантів, мкмоль/дц^3	Кількість анексин-позитивних клітин крові, %	1	0,76	<0,05
		2	0,99	<0,05
		3	0,80	<0,05
		4	0,77	<0,05
Рівень активних форм кисню у клітинах, %	Кількість анексин-позитивних клітин крові, %	1	0,79	<0,05
		2	0,99	<0,05
		3	0,97	<0,05
		4	0,76	<0,05
Рівень активних форм кисню у клітинах, %	Рівень ТБК-реактантів, мкмоль/дц^3	1	0,68	<0,05
		2	0,99	<0,05
		3	0,74	<0,05
		4	0,92	<0,05

Наші дані підтверджують те, що при експериментальній непроникаючій механічній травмі рогівки мітохондрії відіграють одну з провідних ролей в реалізації апоптичної програми у клітині за рахунок зниження трансмембранного потенціалу [4, 14] і гіперпродукції активних форм кисню. Сигнальним шляхом ініціації апоптозу клітин крові за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки є мітохондрійопосередкований (пряма залежність між зростанням ТБК-реактантів (r=0,99; p<0,05), активних форм кисню (r=0,99; p<0,05) та відсотком анексинпозитивних клітин крові через 7 год).

Висновки. 1. При експериментальній непроникаючій механічній травмі рогівки достовірно зростають рівні активних форм кисню та спонтанного апоптозу клітин протягом 21 доби спостереження з максимумами на 3-й і 14-й день.

2. Сигнальним шляхом ініціації апоптозу ядровмісних клітин крові за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки є мітохондрійопосередкований (пряма залежність між зростанням ТБК-реактантів, активних форм кисню та відсотком анексинпозитивних клітин крові (r=0,99; p<0,05) через 7 год).

Перспективи подальших досліджень. У перспективі буде досліджуватися вплив різних методів лікування на активність оксидаційного стресу за умови експериментальної непроникаючої травми рогівки в динаміці.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Красновид Т. А. Травматичні пошкодження ока з внутрішньоочними сторонніми тілами / Т. А. Красновид // Новости медицины и фармации. – 2011. – № 363. – Режим доступу : http://www.mif-ua.com/archive/article/17122
2. Куликов В. Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) / В. Ю. Куликов // Медицина и образование в Сибири. – 2009. – № 4. – С. 47–58.
3. Малышев В. Е. Опыт применения препарата мексидол в комплексном амбулаторном лечении больных с заболеваниями глаз дегенеративно-дистрофического происхождения / В. Е. Малышев, О. И. Сальников / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Приложение 1. – С. 55–57.
4. Меньщикова Е. Б. Окислительныйстресс / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // Прооксиданты и антиоксиданты. – М. : Слово, 2006. – 556 с.
5. Михайлова О. А. Оценка активных форм кислорода ядросодержащих клеток кордовой крови в зависимости от метода выделения / О. А. Михайлова, П. М. Зубов // Матеріали X наукової конференції молодих вчених з міжнородною участю "Актуальні питання геронтології та геріатрії", присвяченої пам'яті академіка Володимира Веніаміновича Фролькіса (Київ, 26 січня 2011 року). – К. : ДУ "Інститут геронтології НАМН України". – 2011. – С. 34.
6. Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядросодержащих клеток кордовой крови после криоконсервирования / Л. А. Бабийчук, П. М. Зубов, О. А. Михайлова, В. В.Рязанцев // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – (Серия "Медицина. Фармация"). – 2013. – № 18, Т. 23. – Режим доступа: http://cyberleninka.ru/article/n/strukturno-funktsionalnoe-sostoyanie-i-zhiznesposobnost-yadrosoderzhaschih-kletok-kordovoy-krovi-posle-kriokonservirovaniya
7. A five-year retrospective study of the epidemiological characteristics and visual outcomes of patients hospitalized for ocular trauma in a Mediterranean area / S. Cillino, A. Casuccio, F. Di Pace [et al.] // BMC Ophthalmol. – 2008. – Vol. 22. – P. 8–16.
8. Bhogal G. Penetratingocularinjuriesinthehome / G. Bhogal, P. J. Tomlins, P. I. Murray // J. Public Health – 2007. – Vol. 29. – P. 72–74.
9. 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.
10. McGwin G. The rate of eye in juryin the United States / G. McGwin, A. Xie, C. Owsley // Arch. Ophthalmol. – 2005. – Vol. 123. – P. 970–976.
11. Mechanical injuries of the eye / A. Potockova, P. Strmen, V. Krasnik, Z. Olah // Bratisl. Lek. Listy. – 2010. – Vol. 111 (6). – P. 329–335.
12. Naik B. S. A study on sociodemographic profile of patients attending government hospital tirupati with mechanical ocular injuries / B. S. Naik, S. R. Dudala // International Journal of Research in Health Sciences. – 2013. –Vol. 1, Iss. 1. – P. 28–33.
13. Negrel A. D. Magnitude of eye injuries worldwide / A. D. Negrel // Community Eye Health Journal. – 1997. – Vol. 10 (24). – P. 49–53.
14. Tiwari B. S. Oxidative stress increase drespiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed celldeath / B. S. Tiwari B. Belenghi, A. Levine // Plant Physiology. – 2002. – Vol. 128. – P. 1271–1281.

Отримано 15.10.14