

Nesteruk S.V., Klishch I.M. The role of active forms of oxygen in the apoptosis mechanisms in case of experimental injury of the cornea and the ways of its correction. Journal of Education, Health and Sport. 2017;7(8):1750-1756. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1211455>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/5399>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part b item 1223 (26/01/2017).

1223 Journal of Education, Health and Sport eissn 2391-8306 7

© The Authors 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 05.08.2017. Revised: 10.08.2017. Accepted: 31.08.2017.

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

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У МЕХАНІЗМАХ АПОПТОЗУ ЗА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТРАВМИ РОГІВКИ ТА ШЛЯХИ ЇЇ КОРЕКЦІЇ

Нестерук С.В., Кліщ І.М.

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»

Резюме. Метою нашого дослідження було з'ясувати особливості коригуючого впливу препарату, створеного на основі біологічної сировини – концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней, на рівень активних форм кисню й апоптичну загибель клітин крові при експериментальній механічній непроникаючій травмі рогівки.

За умови непроникаючої механічної травми рогівки спостерігається інтенсифікація вільнорадикальних процесів (підвищення рівнів АФК до 14 доби на 200,5 %) і зростання спонтанного апоптозу (на 138,9 % через 14 діб експерименту), $p < 0,001$.

Застосування тваринам крапель до очей «Ефіаль» й очного гелю «Солкосерил», яким моделювали механічну травму рогівки позитивно впливало на показники активних форм кисню й спонтанного апоптозу вже з 3-ї доби експерименту. Корекція концентратом депротейнізованого дермального шару шкіри свиней є вірогідно ефективнішою стосовно дії референтного препарату депротейнізованого гемодеривату з крові телят, особливо після 10 доби експерименту.

Наші дані вказують на те, що при експериментальній непроникаючій механічній травмі рогівки мітохондрії відіграють важливу роль у реалізації клітинної загибелі за рахунок гіперпродукції активних форм кисню, при цьому одним з шляхів ініціації апоптозу є мітохондрій-опосередкований.

Ключові слова: травма рогівки, активні форми кисню, апоптоз, корекція, експеримент

THE ROLE OF ACTIVE FORMS OF OXYGEN IN THE APOPTOSIS MECHANISMS IN CASE OF EXPERIMENTAL INJURY OF THE CORNEA AND THE WAYS OF ITS CORRECTION

Nesteruk S.V., Klishch I.M.

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University

Abstract. The purpose of our study was to find out the peculiarities of the corrective effect of a drug created on the basis of biological raw material - a concentrate of a deproteinized thermal layer of pig skin, on the free oxygen radicals level and apoptotic death of blood cells in an experimental mechanical non-penetrating corneal trauma.

During the non-penetrating mechanical corneal injury, intensification of free radical processes (increase of AFK levels up to 14 days by 200.5%) and growth of spontaneous apoptosis (138.9% after 14 days of the experiment) were determined.

The application of drops to the eyes "Efiol" and eye gel "Solcoseryl" to animals with mechanical injury to the cornea had a positive effect on the indicators of active forms of oxygen and spontaneous apoptosis from the 3rd day of the experiment. Correction with the concentrate of the deproteinized heat layer of the pig's skin is probably more effective with respect to the action of the reference preparation of deproteinized hemoderivate from the blood of calves, especially after 10 days of the experiment.

Our data indicate that in the experimental non-penetrative mechanical trauma of the cornea, mitochondria play an important role in the implementation of cell death due to hyperproduction of active forms of oxygen, while one of the ways of initiation of apoptosis is mitochondria-mediated.

Key words: corneal trauma, active forms of oxygen, apoptosis, correction, experiment

Вступ. Механічна травма органу зору є однією з основних причин втрати зору й ока як органа. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я серед головних причин втрати зору рогівкова сліпота займає 4 місце [1]. Протікання посттравматичного періоду після механічної травми рогівки у 14-28% випадків ускладнюється хронічним вірусним процесом, а в 7-25% - розвитком внутрішньоочної інфекції, що веде до різкого зниження зору та працездатності травмованих осіб [2]. Внаслідок травми і запалення формується більмо рогівки, яке у 4 % пацієнтів є причиною сліпоти [3]. Літературні дані засвідчують, що травми органу зору внаслідок виробничого і дорожньо-транспортного травматизму у дорослих і побутового травматизму у дітей, зумовлюють сліпоту більше ніж в 1 млн жителів економічно розвинутих країн, ставши причиною переважно монокулярної сліпоти [4]. В Україні основними причинами інвалідності в офтальмопатології є наслідки травм ока та орбіти (27,0 %), глаукома (17,0 %), захворювання очного дна (16,3 %), міопія (12,3 %), атрофія зорового нерва (6,6 %) та вроджені вади розвитку (5,1 %) [5]. Тому, своєчасна діагностика, можливість прогнозування характеру протікання травми очей та адекватна корекція є актуальними напрямками наукових досліджень в офтальмотравматології.

Розробка препаратів біологічного походження, які вміщують біологічно активні молекули, які отримані від людей чи інших ссавців, є перспективним напрямом фармацевтичної науки [6]. Варто відмітити, що ряд таких лікарських засобів вже дозволені до клінічного застосування, а деякі проходять клінічну апробацію. В останнє

десятиріччя часто використовують кріоконсервовані матеріали для закриття поверхонь ран та їх загоєння. На основі біологічної сировини – концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней, розроблено препарат «Ефіаль» (Фармак). Дослідниками встановлено його ранозагоювальну й антимікробну дію [7], на даний час продовжується вивчення спектру біологічної дії даного препарату.

Тому, **метою нашого дослідження** було з'ясувати особливості коригуючого впливу препарату, створеного на основі біологічної сировини – концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней, на рівень активних форм кисню й апоптичну загибель 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 у відповідності з Женевською конвенцією “International Guiding principles for Biochemical research involving 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».

Тварин поділили на 2 групи: контрольна – інтактні тварини (6 кролів) та дослідні – непроникаюче поранення рогівки, термін спостереження 3 (1 група), 7 (2 група), 10 (3 група) та 14 (4 група) діб після травми (54 кролі); непроникаюче поранення та препарат Ефіаль, термін спостереження 3 (5 група), 7 (6 група), 10 (7 група) та 14 (8 група) діб після травми (54 кролі); непроникаюче поранення та Солкосерил, термін спостереження 3 (9 група), 7 (10 група), 10 (11 група) та 14 (12 група) діб після травми (54 кролі);.

Експериментальна модель пошкодження рогівки відтворювалась на обох очах тварини під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином алкаїну 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 клапот товщиною до 0,2 мм). Контроль відтворення ерозії здійснювали методом фарбування рогівки 0,5 % розчином флюоресцеїну. Забір крові у різні терміни спостереження проводили з вушної вени зовнішнього краю вуха кролів.

Досліджуваний препарат –концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней (КДТШШС) «Ефіаль» у лікарській формі крапель до очей, виробництва ПАТ «Фармак» [8]. Референтним препаратом за фармакологічною дією вибрано очний гель «Солкосерил» (депротейнізований гемодериват з крові телят), виробництво «Valeant Pharmaceuticals Switzerland GmbH, Швейцарія».

Кількість лейкоцитів периферичної крові з ознаками апоптозу визначали за допомогою проточного цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, США). Використовували набір ANNEXIN V-FITC-kit (Bender Medsystems, Австрія), де за допомогою анексину V виявляли клітини, які вступили в апоптоз (AN+ -клітини). [9]

Для визначення кількості клітин з підвищеним рівнем активних форм кисню (АФК) використовували дихлорфлуоресцеїну діацетат (ДХФ-ДА) («Sigma Aldrich», USA) за допомогою проточної цитофлуориметрії Epics XL (Beckman Coulter, США) [10]. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках (кількість лейкоцитів із підвищеним внутрішньоклітинним вмістом АФК (АФК+ -клітини) до кількості загальної кількості клітин).

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Excel» (Microsoft, США) та «STATISTICA» 6.0. («Statsoft», США) з використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. 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 Мана-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Встановлено зростання відсотку лейкоцитів із високим вмістом АФК за умови механічної непроникаючої травми рогівки. Так, досліджуваний показник достовірно зріс через 3 доби на 78,4 %, через 7 діб – на 68,2 %, через 10 діб – на 201,1 % і через 14 діб – на 200,5 %, порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$). Слід зазначити, що відсоток АФК+ -клітин у крові тварин у 3 і 4 дослідних групах практично не відрізнявся і був достовірно вищий (на 79,0 %) даних 2 групи ($p < 0,01$) (табл. 1). Застосування Ефіалю при механічній непроникаючій травмі рогівки також супроводжувалося зростанням відсотку лейкоцитів із високим вмістом АФК у 5-й групі на 46,4 %, у 6-й – на 33,3 %, у 7-й – на 82,9 % і в 8-й – на 68,9 %, порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$). Отримані дані свідчать про зменшення вільнорадикального окиснення при застосуванні Ефіалю при механічній непроникаючій травмі рогівки. Так, досліджуваний показник при застосуванні препарату, створеного на основі запропонованої біологічної сировини був достовірно нижчий через 3 доби на 32,0 %, через 7 діб – на 34,9 %, через 10 діб – на 118,2 % і через 14 діб – на 131,6 %, порівняно з групою без корекції ($p < 0,01$). Застосування референтного препарату «Солкосерил» щурам при механічній непроникаючій травмі рогівки також зумовлювало зниження відсотку лейкоцитів із високим вмістом АФК, порівняно з групою без корекції: у 9-й групі на 19,5 %, у 10-й – на 16,8 %, у 11-й – на 75,5 % і в 12-й – на 65,3 % ($p < 0,01$). Порівнюючи ефективність коригуючих чинників встановлено, що застосування Ефіалю при механічній непроникаючій травмі рогівки веде до статистично значимішого зниження продукції АФК у посттравматичному періоді через 3 доби на 12,5 %, через 7 діб – на 18,1 %, через 10 діб – на 42,7 % і через 14 діб – на 66,3 %, $p < 0,05$ (табл. 1). Результати нашого дослідження показали сповільнення утворення АФК при застосуванні Ефіалю, що може бути пов'язано з активацією ферментів антиоксидантного захисту. Солкосерил захищає тканини, які знаходяться у стані гіпоксії та дефіциту живлення, сприяє регенерації тканин, прискорює та поліпшує загоєння ран, проте має менш виражені антиоксидантні властивості.

Таблиця 1 - Рівень лейкоцитів із підвищеним внутрішньоклітинним вмістом АФК у крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції (M+m)

Дослідні групи	Контрольна група (n=6)	Термін спостереження			
		3 доби (n=18)	7 діб (n=14)	10 діб (n=10)	14 діб (n=6)
Механічна непроникаюча травма рогівки	23,50± 0,83	41,92 ± 0,55*	39,52± 0,95* p ₁ >0,05	70,75 ± 1,38* p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	70,63 ± 0,71* p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05
Застосування Ефіалю при механічній непроникаючій травмі рогівки		34,40± 0,61*	31,31 ± 0,61* p ₁ >0,05	42,98 ± 0,57* p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	39,70± 0,46* p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05
Застосування Солкосерилу при механічній непроникаючій травмі рогівки		37,21± 0,51*	35,45 ± 0,62* p ₁ >0,05	52,82 ± 0,86*^ p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	55,08 ± 1,02*^ p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05
Примітки:					
<ol style="list-style-type: none"> * – різниця достовірна між контрольною і дослідними групами p₁ – різниця достовірна між 1 і 2 групами; p₂ – різниця достовірна між 2 і 3 групами; p₃ – різниця достовірна між 3 і 4 групами. 					

Активация вільнорадикального окиснення супроводжувалася зростанням спонтанного апоптозу. Так, при механічній непроникаючій травмі рогівки AN⁺-клітини достовірно зростали через 3 доби на 55,3 %, через 7 діб – на 73,4 %, через 10 діб – на 98,0 % і через 14 діб – на 138,9 %, порівняно з контрольною групою (p<0,001). Застосування Ефіалю при механічній непроникаючій травмі рогівки також супроводжувалося зростанням кількості лейкоцитів з ознаками апоптозу у 5-й групі на 42,2 %, у 6-й – на 30,9 %, у 7-й – на 75,2 % і в 8-й – на 71,3 %, порівняно з контрольною групою (p<0,001). Отримані дані свідчать про зменшення ініціації апоптичної загибелі лейкоцитів при застосуванні Ефіалю на фоні механічної непроникаючої травми рогівки. Так, досліджуваний показник при застосуванні препарату, створеного на основі запропонованої біологічної сировини був достовірно нижчий через 3 доби на 13,1 %, через 7 діб – на 42,5 %, через 10 діб – на 22,8 % і через 14 діб – на 67,6 %, порівняно з групою без корекції (p<0,01). Застосування референтного препарату «Солкосерил» щурам при механічній непроникаючій травмі рогівки також зумовлювало зниження кількості AN⁺-клітин, порівняно з групою без корекції: у 9-й групі на 47,3 %, у 10-й – на 46,8 %, у 11-й – на 107,1 % і в 12-й – на 120,0 % (p<0,01). Порівнюючи ефективність коригуючих чинників встановлено, що застосування Ефіалю при механічній непроникаючій травмі рогівки веде до статистично значимішого зниження спонтанного апоптозу у посттравматичному періоді, стосовно Солкосерилу, через 7 діб – на 16,0 %, через 10 діб – на 31,9 % і через 14 діб – на 48,7 %, p<0,05 (табл. 2).

Таблиця 2 - Кількість лейкоцитів периферичної крові з ознаками апоптозу за умови механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції (M+m)

Дослідні групи	Контрольна група (n=6)	Термін спостереження			
		3 доби (n=18)	7 діб (n=14)	10 діб (n=10)	14 діб (n=6)
Механічна непроникаюча травма рогівки	2,64±0,16	4,09±0,16*	4,57±0,19*	5,22±0,15*	6,30±0,28* p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
Застосування Ефіалю при механічній непроникаючій травмі рогівки		3,75±0,10*	3,45±0,12*	4,62±0,18*	4,52±0,18* p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05
Застосування Солкосерилу при механічній непроникаючій травмі рогівки		3,88±0,05*	3,87±0,06*	5,46±0,14*	5,80±0,22* p ₁ >0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05
Примітки:					
1. * – різниця достовірна між контрольною і дослідними групами					
2. p ₁ – різниця достовірна між 1 і 2 групами;					
3. p ₂ – різниця достовірна між 2 і 3 групами;					
4. p ₃ – різниця достовірна між 3 і 4 групами.					

Наші дані вказують на те, що при експериментальній непроникаючій механічній травмі рогівки мітохондрії відіграють важливу роль у реалізації клітинної загибелі за рахунок гіперпродукції активних форм кисню, при цьому одним з шляхів ініціації апоптозу є мітохондрій-опосередкований.

Висновок. За умови непроникаючої механічної травми рогівки спостерігається інтенсифікація вільнорадикальних процесів (підвищення рівнів АФК до 14 доби на 200,5 %) і зростання спонтанного апоптозу (на 138,9 % через 14 діб експерименту), p<0,001.

Застосування тваринам крапель до очей «Ефіаль» й очного гелю «Солкосерил», яким моделювали механічну травму рогівки позитивно впливало на показники активних форм кисню й спонтанного апоптозу вже з 3-ї доби експерименту. Корекція концентратом депротейнізованого дермального шару шкіри свиней є вірогідно ефективнішою стосовно дії референтного препарату депротейнізованого гемодеривату з крові телят, особливо після 10 доби експерименту.

References

1. Hazamova, A.I., Hazamova, E.N., & Chentsova, E.V. (2017). Rol mikrotravmy rogovitsy v razvitii bakterialnyh yazv [The role of the microtrauma of the cornea in the development of bacterial ulcers]. *Oftalmologiya – Ophthalmology*, 14 (2), 136-140 [in Ukrainian].
2. Polianska, N.K., Fursova, N. Yu., & Karpov, S.Y. (2013). Diahnostyka mekhanichnoi travmy rohiv z vykorystanniam infrachervonoj spektroskopii [Diagnosis of mechanical injury of horns using infrared spectroscopy]. *Visnyk oftalmologii – Herald of Ophthalmology*, 1, 49-52 [in Ukrainian].

3. Bhogal, G., Tomlins, P. J., & Murray, P.I. (2007). Penetrating ocular injuries in the home. *J. Public Health*, 29, 72-74.
4. Varyvonchik D.V. (2016). Svitovi epidemiolohichni kharakterystyky poshyrenosti porushen zoru [World epidemiological characteristics of the prevalence of visual impairment]. *Mizhnarodnyi naukovo-praktychnyi zhurnal "Oftalmolohiia" – International scientific and practical journal "Ophthalmology"*, 1 (03), 12-20 [in Ukrainian].
5. Alifanova, T.A., Alifanov I.S., Zosimova, Ya.O., & Hladchenko, Yu.Iu. (2008). Epidemiolohichni aspekty invalidnosti vnaslidok patolohii orhana zoru v Ukraini [Epidemiological aspects of disability due to pathology of the organ of vision in Ukraine]. Modern aspects of the clinic, diagnostics and treatment of eye disease materials: *Mizhnarodna naukova konferentsiia, prysviachena 100-richchii z dnia narodzhennia akademika N. O. Puchkivskoi (29–30 travnia 2008 roku). – International scientific conference devoted to the 100th anniversary of the birth of Academician N.O. Puchkivska*, (p. 6). Odesa [in Ukrainian].
6. Borshchevskiy, N.Ie., Lisnychuk, K.S., & Volkov, M.I. (2013). Ranozahoiuvalna diia preparatu «Efial» [Wound healing effect of the drug "Efial"]. *Farmatsevychnyi chasopys – Pharmaceutical magazine*, 3, 29-34 [in Ukrainian].
7. Borshchevskiy, H.I., Railko, Z.O., & Reida, V.P. (2015). Vyprobuvannia efektyvnosti antymikrobnnykh konservantiv preparatu «Efial» [Tests of the effectiveness of antimicrobial preservatives of the drug "Efial"]. *Instytut imeni Mechnikova – Annals of Mechnikov Institute*, 1, 44-48 [in Ukrainian].
8. Zhebrowska, F.I., Kostiuk, H.V., Borshchevskiy, H.I., Borshchevska, M.I., Bihuniak, V.V. Sposib otrymannia farmatsevychnoi kompozytsii ranozahoiuiuchoi ta reheneruiuchoi dii na osnovi peptydiv termalnoho sharu shkiry svynei [A method of obtaining a pharmaceutical composition of anaesthetizing and regenerating action based on peptides of a heat layer of pig skin]. Patent Ukrayina, № 101235, 2013.
9. Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., et al. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31 (1), 1-9.
10. Dambaeva, S.V., Mazurov, D.V., & Pinyagin V.V. (2001). Otsenka produktsii aktivnyih form kisloroda metodom lazernoy protochnoy tsitometrii v kletkah perifericheskoy krovi cheloveka [Evaluation of the production of active forms of oxygen by laser flow cytometry in human peripheral blood cells]. *Immunologiya – Immunology*, 6, 58-61. [in Ukrainian].