

© Марущак М.І., Худоб'як М.М., Габор Г.Г., Мялюк О.П.

УДК: 616.24-099-06:611.018.1-003.826]-092.9

Марущак М.І.<sup>1</sup>, Худоб'як М.М.<sup>2</sup>, Габор Г.Г.<sup>1</sup>, Мялюк О.П.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського" (вул. Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, Україна, 46001), <sup>2</sup>Рівненська центральна міська лікарня (вул. Мірющенка, 25А, м. Рівне, Україна, 33018), <sup>3</sup>Рівненський державний базовий медичний коледж (вул. М. Карнаухова, 53, м. Рівне, Україна, 33018)

## МІТОХОНДРІАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ ПРИ ПОЄДНАНІЙ ТРАВМІ ГРУДНОЇ КЛІТКИ І СТЕГОН ТА ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ АНТИОКСИДАНТІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Резюме.** Метою нашого дослідження було встановити особливості апоптозу при поєднаній травмі грудної клітки і стегон та обґрунтувати ефективність застосування антиоксидантів при даній патології. Виявлена статистично значима гіперпродукція активних форм кисню лейкоцитами вже через 1 добу експерименту, яка зумовлює дезорганізацію біоелектричної активності мембран мітохондрій, що характеризується динамічним зростанням відсотку клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом з максимумом через 7 діб (в 2, 6 рази показник вищий контролю,  $p \leq 0,001$ ) у посттравматичному періоді після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон. Встановлено також динамічне, статистично значиме зростання відсотку лейкоцитів з ознаками апоптозу вже з 1 доби експерименту з найвищими значеннями у період 7-14 доби. Виявлено статистично значимий, середньої сили зв'язок між активними формами кисню і вираженістю апоптозу у перші 7 діб та через 28 днів ( $p \leq 0,05$ ), а також достовірну взаємозалежність між рівнем трансмембранного потенціалу і апоптозом через 3 ( $r_{xy} = 0,63$ ) і 7 діб ( $r_{xy} = 0,70$ ). Застосування антиоксидантів у посттравматичному періоді поєднаної травми грудної клітки та обох стегон має позитивний ефект, який характеризується зниженням відсотку активних форм кисню (дія емоксипіну проявляється через 7 і 28 діб, мексикору - вже через 3 дні з максимумом дії через 7 діб). Відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом та FITC Annexin V-позитивних клітин лейкоцитарної суспензії зменшується при застосуванні обох коригуючих чинників, проте позитивний вплив мексикору, відносно емоксипіну, є вірогідно вищим.

**Ключові слова:** поєднана травма, вільні радикали, трансмембранний потенціал, апоптоз, корекція.

### Вступ

У патогенезі багатьох захворювань структурно-функціональна перебудова мітохондрій відіграє значну роль, оскільки вони контролюють процеси енергозабезпечення клітини, окисно-відновний і кальцієвий гомеостаз, шляхи мітохондрій-опосередкованого чи рецептор-незалежного апоптозу, забезпечують механізми сигнальної трансдукції в контролі ядерної функції [7, 18]. Відомо, що до 30 % об'єму клітини займають мітохондрії, які структурно складаються з матриксу, оточеного внутрішньою і зовнішньою мембранами та міжмембранним простором, де містяться апоптичні фактори [11]. Дослідження показують, що на фоні гіпоксії накопичуються вільні кисневі радикали, які пошкоджують поліненасичені жирні кислоти мембран клітин, що супроводжується дезорганізацією їх біоелектричної активності [20, 21]. Результати наших попередніх досліджень вказують на розвиток тканинної гіпоксії у ранньому посттравматичному періоді поєднаної травми грудної клітки та обох стегон у щурів. Також нами показано зростання відсотку активних форм кисню в лейкоцитарній суспензії крові у посттравматичному періоді вже через 1 добу з прогресуючою динамікою [12]. Аналізуючи отримані результати та літературні дані можна припустити, що пошкодження зовнішньої мембрани клітин супроводжується їх апоптичною загибеллю.

Тому, метою нашого дослідження було встановити особливості апоптозу при поєднаній травмі грудної клітки і стегон та обґрунтувати ефективність застосування антиоксидантів при даній патології.

### Матеріали та методи

Експериментальне дослідження виконано на 150 дорослих нелінійних білих щурах-самцях масою 200-210 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію з підтриманням харчового і питного режимів на рівні, рекомендованому нормами утримання лабораторних тварин. Усіх тварин було поділено на вісім груп: контрольну (1-а), групу порівняння (травма грудної клітки й обох стегон (ТГК+2С), спостереження 1, 3, 7, 14 і 28 діб) і дві дослідні групи: 3-а - (ТГК+2С, корекція емоксипіном, спостереження 1, 3, 7, 14 і 28 діб), 4-а - (ТГК+2С, корекція мексикором, спостереження 1, 3, 7, 14 і 28 діб). Тваринам дослідної групи під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг маси тіла щура внутрішньочеревно) за допомогою троакара моделювали правобічний закритий пневмоторакс із переломом ребра та поєднували їх з переломом лівої і правої стегнових кісток. Скелетну травму моделювали шляхом нанесення однократного дозованого удару спеціально розробленим пристроєм по кожному стегну, який викликав закритий перелом [6]. Енергія удару становила 0,375 Дж, що відповідало травмі середнього ступеня тяжкості. Поєднану травму моделювали шляхом послідовного нанесення обох ушкоджень. При роботі з тваринами дотримувались правил поводження з експериментальними тваринами. Смертність тварин у кожній групі становила: у 2-й (1 доба - 12/11, 3 доба - 12/9, 7 доба - 12/10, 14 доба - 12/10, 28 доба - 12/9), відповідно у 3-й (8/8, 8/6, 8/6, 8/7, 8/7) і у 4-й (8/8, 8/6, 8/7, 8/7, 8/7). Мексикор та препарат порівняння Емоксипін (3-окси-6-метил-2-етилпі-

ридину гідрохлорид) вводили тваринам внутрішньочеревно 1 раз на добу протягом 14 днів, починаючи з виходу щурів із наркозу, в таких дозах: емоксипін - 100 мг/кг, мексикор - 40 мг/кг [5]. Щурів виводили з експерименту шляхом тотального кровопускання із серця під тіопентал-натрієвим наркозом (60 мг/кг маси тіла тварини внутрішньочеревно).

Для визначення рівня апоптозу лейкоцитарну суспензію крові ресуспензували в попередньо розведеному (1:10) зв'язуючому буфері з набору реактивів "ANNEXIN V FITC" ("Beckman Coulter", США), підраховували їх кількість клітин у камері Горяєва та доводили їх кількість до  $1 \times 10^6$  кл/мл. Відбирали 100 мкл суспензії клітин до пробірки, додавали 5 мкл FITC анексину V і 5 мкл пропідій йодиду (PI). Змішували клітини та інкубували при кімнатній температурі у зв'язуючому буфері. В якості негативного контролю використали немічені клітини. Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі "Beckman Coulter" (США), використовуючи програмне забезпечення апарату. Результати виражали у вигляді відсотку клітин, які приєднали FITC Annexin V чи PI. Клітини є живі, коли вони є FITC Annexin V і PI негативні, а коли FITC Annexin V позитивні - то знаходяться у стадії апоптозу, якщо FITC Annexin V і PI позитивні - в стадії необоротного апоптозу (некрозу). Рівень АФК визначали за допомогою дихлорфлуоресцеїну діацетат ("Sigma Aldrich", USA), який є барвником із заблокованою флуоресценцією, кількість клітин лейкоцитарної суспензії із зниженим трансмембральним потенціалом мітохондрій ( $\Delta\psi$ ) за допомогою набору "MitoScreen" ("BD Pharmigen", США) у крові на проточному цитометрі [15, 17, 22].

Утримували щурів та проводили експерименти відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986),

Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001).

Статистичну обробку даних проводили з урахуванням перевірки показників на нормальний розподіл за тестом Колмогорова - Смірнова. Для опису ознаки застосовували медіану та інтерквартильний розмах (Me [Q25-Q75]); для порівняльного аналізу застосовували непараметричний (U-критерій) Вілкоксона - Манна - Уїтні. Кореляційний аналіз проводили за методом Спірмена ( $\rho$ ) [8].

### Результати. Обговорення

Отримані результати вказують на те, що після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон у щурів зростає продукція АФО клітинами лейкоцитарної суспензії крові: через 1 добу в 2,5 рази, через 3 доби в 2,8 рази, досягаючи максимуму через 7 днів, коли даний показник в 3,2 рази був вищий контрольних значень (табл. 1). Продукція АФО клітинами лейкоцитарної суспензії в наступні терміни спостереження (14 і 28 доби) хоча й зменшувалася на 11,0 % проти даних на 7 добу, проте залишалася у 2,8 рази більшою контролю. Таку ж тенденцію відмічено щодо зміни відсотку клітин лейкоцитів зі зниженим трансмембральним потенціалом. Так, максимальне значення досліджуваного показника виявлено через 7 днів експерименту, перевищуючи у 2,6 рази дані 1 групи. Аналіз кількості клітин лейкоцитарної суспензії з ознаками апоптозу свідчить про динамічне, статистично значиме їх зростання вже з 1 доби експерименту з найвищими значеннями у період 7-14 доби (табл. 1).

Відомо, що сигнальні шляхи запуску апоптозу є різні [13], проте нашим завданням було оцінити вплив власне мітохондріального. Встановлено статистично значимий, середньої сили зв'язок між АФО і вираженістю

**Таблиця 1.** Показники мітохондріального шляху апоптозу після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон (Me [Q25-Q75]).

| Показник                              | Відсоток активних форм кисню лейкоцитарної суспензії | Відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембральним потенціалом | FITC Annexin V-позитивні клітини лейкоцитарної суспензії, % |
|---------------------------------------|--|--|---|
| Контроль, (n=10)                      | 17,7 [17,4; 18,1]                                    | 1,3 [1,2; 1,6]   | 5,4 [5,1; 5,8]  |
| ТГК+2С, 1 доба спостереження, (n=11)  | 42,6* [41,9; 42,6]                                   | 1,5* [1,4; 1,6]  | 6,2* [6,1; 6,6]   |
|                                       | $p \leq 0,001$                                       | $p \leq 0,001$   | $p = 0,01$  |
| ТГК+2С, 3 доби спостереження, (n=9)   | 48,7* [46,1; 50,5]                                   | 2,6* [2,5; 2,8]  | 6,6* [6,4; 6,8]   |
|                                       | $p \leq 0,001$                                       | $p \leq 0,001$   | $p \leq 0,001$  |
| ТГК+2С, 7 днів спостереження, (n=10)  | 56,5* [54,7; 57,8]                                   | 3,5* [3,2; 3,9]  | 7,8* [7,4; 8,1]   |
|                                       | $p \leq 0,001$                                       | $p \leq 0,001$   | $p \geq 0,05$   |
| ТГК+2С, 14 днів спостереження, (n=9)  | 50,1* [47,5; 51,9]                                   | 3,0* [2,8; 3,2]  | 7,8* [7,5; 7,9]   |
|                                       | $p \geq 0,05$  | $p \leq 0,01$  | $p \leq 0,001$  |
| ТГК+2С, 28 днів спостереження, (n=10) | 50,5* [48,4; 51,8]                                   | 2,6* [2,4; 2,7]  | 7,2* [7,1; 7,2]   |

**Примітки:** \* - різниця достовірна у порівнянні з контрольними тваринами ( $p \leq 0,05-0,001$ ), p - різниця достовірна між дослідними групами.

**Таблиця 2.** Кореляційні зв'язки відсотку апоптичної загибелі клітин лейкоцитарної суспензії з показниками активних форм оксигену і трансмембранного потенціалу за поєднаної травми грудної клітки та обох стегон в динаміці (гху).

| Показник  | АФО клітин лейкоцитарної суспензії крові  |        |        |         |         |
|---|---|--------|--------|---------|---------|
|   | 1 доба  | 3 доба | 7 доба | 14 доба | 28 доба |
| FTC Annexin V-позитивні клітини лейкоцитарної суспензії | 0,52*   | 0,56*  | 0,56*  | 0,31    | 0,57*   |
|   | Відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом |        |        |         |         |
|   | 1 доба  | 3 доба | 7 доба | 14 доба | 28 доба |
|   | 0,23  | 0,63*  | 0,70*  | 0,36    | 0,43    |

**Примітки:** 0,7-1,0 - сильна залежність, 0,30-0,69 - середня залежність, 0-0,29 - слабка залежність; \* - достовірність відмінностей коефіцієнтів кореляції - ( $p < 0,05$ ).

**Таблиця 3.** Показники мітохондріального шляху апоптозу після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон та за умов корекції емоксипіном (Me [Q25-Q75]).

| Показник                            | Відсоток активних форм оксигену лейкоцитарної суспензії | Відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом | FTC Annexin V-позитивні клітини лейкоцитарної суспензії, % |
|-------------------------------------|---|---|--|
| Контроль, (n=10)                    | 17,7 [17,4; 18,1]                                       | 1,3 [1,2; 1,6]  | 5,4 [5,1; 5,8]   |
| ТГК+2С, 1 доба спостереження, (n=8) | 42,2* [40,8; 43,6]                                      | 1,5 [1,4; 1,5]  | 6,0 [5,8; 6,1]   |
|                                     | $p \leq 0,05$   | $p \leq 0,001$  | $p \geq 0,05$  |
| ТГК+2С, 3 доби спостереження, (n=6) | 48,4* [47,2; 49,0]                                      | 2,3* [2,1; 2,4]   | 6,4* [6,3; 6,5]  |
|                                     | $p \leq 0,05$   | $p \leq 0,001$  | $p \leq 0,01$  |
| ТГК+2С, 7 дб спостереження, (n=6)   | 51,4* [50,0; 54,1]                                      | 3,1* [2,8; 3,2]   | 6,9* [6,8; 7,0]  |
|                                     | $p \leq 0,05$   | $p \geq 0,05$   | $p \geq 0,05$  |
| ТГК+2С, 14 дб спостереження, (n=7)  | 48,6* [47,0; 50,6]                                      | 2,8* [2,6; 3,0]   | 6,8* [6,7; 7,0]  |
|                                     | $p \leq 0,05$   | $p \leq 0,05$   | $p \geq 0,05$  |
| ТГК+2С, 28 дб спостереження, (n=7)  | 45,5* [42,0; 45,7]                                      | 2,1* [2,0; 2,5]   | 6,7* [6,4; 6,9]  |

**Примітки:** \* - різниця достовірна у порівнянні з контрольними тваринами ( $p \leq 0,05-0,001$ ), p - різниця достовірна між дослідними групами.

**Таблиця 4.** Показники мітохондріального шляху апоптозу після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон та за умов корекції мексикором (Me [Q25-Q75]).

| Показник                            | Відсоток активних форм оксигену лейкоцитарної суспензії | Відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом | FTC Annexin V-позитивні клітини лейкоцитарної суспензії, % |
|-------------------------------------|---|---|--|
| Контроль, (n=10)                    | 17,7 [17,4; 18,1]                                       | 1,3 [1,2; 1,6]  | 5,4 [5,1; 5,8]   |
| ТГК+2С, 1 доба спостереження, (n=8) | 41,6* [41,3; 42,1]                                      | 1,5 [1,4; 1,7]  | 5,9* [5,8; 6,1]  |
|                                     | $p \geq 0,05$   | $p \leq 0,01$   | $p \geq 0,05$  |
| ТГК+2С, 3 доби спостереження, (n=6) | 41,9* [41,6; 42,2]                                      | 2,0* [1,8; 2,1]   | 6,1* [6,1; 6,2]  |
|                                     | $p \leq 0,001$  | $p \leq 0,01$   | $p \leq 0,01$  |
| ТГК+2С, 7 дб спостереження, (n=7)   | 39,1* [38,8; 39,3]                                      | 2,5* [2,3; 2,6]   | 6,5* [6,3; 6,6]  |
|                                     | $p \leq 0,001$  | $p \leq 0,01$   | $p \leq 0,05$  |
| ТГК+2С, 14 дб спостереження, (n=7)  | 35,7* [35,2; 37,4]                                      | 2,1* [2,0; 2,2]   | 6,1* [6,0; 6,2]  |
|                                     | $p \leq 0,001$  | $p \leq 0,01$   | $p \geq 0,05$  |
| ТГК+2С, 28 дб спостереження, (n=7)  | 30,4* [30,0; 31,0]                                      | 1,7* [1,6; 1,9]   | 6,0* [5,8; 6,1]  |

**Примітки:** \* - різниця достовірна у порівнянні з контрольними тваринами ( $p \leq 0,05-0,001$ ), p - різниця достовірна між дослідними групами.

апоптозу у всі терміни спостереження, окрім 14 доби. Зазначимо також достовірну взаємозалежність між рівнем трансмембранного потенціалу і апоптозом через 3 і 7 дб. Узагальнюючи отримані дані можна говорити про запуск апоптичної загибелі клітин внаслідок

гіперпродукції АФО та порушення стану внутрішньої мембрани мітохондрій через зниження трансмембранного потенціалу через 3-7 дб після поєднаної травми грудної клітки та обох стегон. Дане твердження свідчить про роль мітохондріального шляху ініціації апоптичної

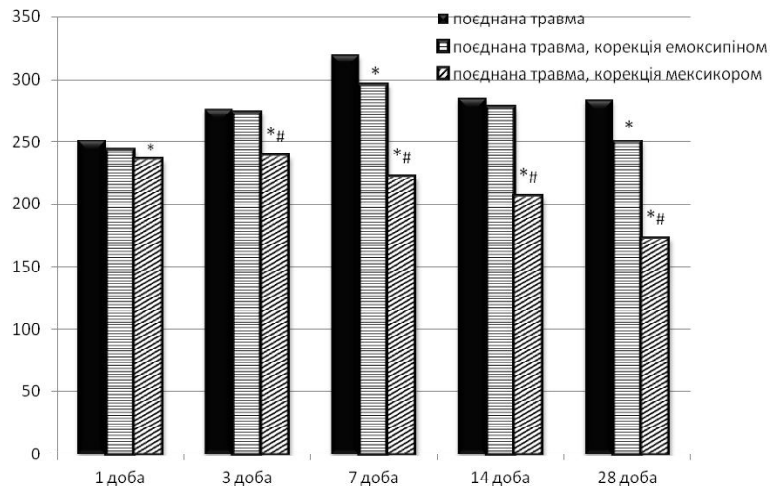
загибелі при поєднаній травмі грудної клітки та обох стегон, проте не заперечує вагомий внесок інших сигнальних шляхів запуску апоптозу. Слід зазначити також той факт, що через 14 діб втрачаються мітохондріальні механізми апоптозу, проте залишаються високі значення FITC Annexin V-позитивних клітин лейкоцитарної суспензії (табл. 2).

Мітохондріальні регуляторні фактори можна використовувати в якості специфічних мішеней для фармакологічного впливу. Відомо, що ефект дії мексикору пов'язаний з антиоксидантною активністю та його здатністю активувати сукцинатдегідрогеназний шлях окиснення глюкози, переключаючи клітинний метаболізм на більш кисневозберігаючий напрямок енергообміну [10]. Найчастіше мексикор використовується в кардіології й неврології, про що свідчать численні публікації [1, 3, 9, 14]. І.В. Задніпраний і Т.П. Сатаєва зазначають, що при надлишку бурштинової кислоти відбувається монополізація сукцинатом дихального ланцюга окиснення, внаслідок чого АТФ швидко ресинтезується і зростає антиоксидантна активність [2].

Аналіз отриманих результатів вказує на те, що застосування як емоксипіну, так і мексикору покращувало досліджувані показники (табл. 3, 4). Порівнюючи динаміку змін АФО, що продукуються клітинами лейкоцитарної суспензії, у посттравматичному періоді встановлено позитивний коригуючий ефект емоксипіну через 7 і 28 діб, тоді як мексикор вже через 3 доби і до кінця терміну спостереження статистично значимо зменшував відсоток АФО з максимумом дії через 7 діб (табл. 3, 4, рис. 1).

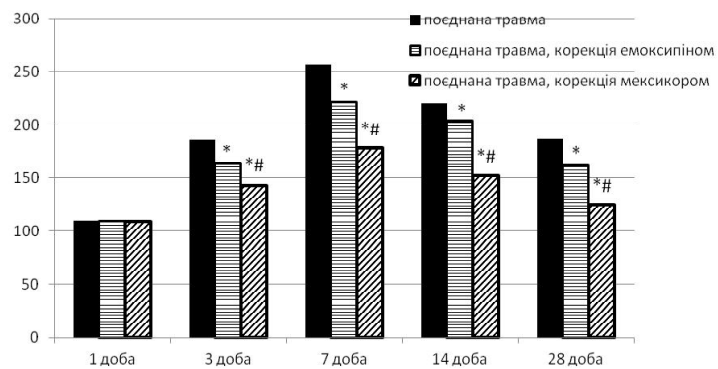
Зменшення продукції АФО зумовлювало зниження негативного їх впливу на мембрани мітохондрій, що знайшло своє відображення у відповідному показнику. Так, відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом зменшувався при застосуванні обох коригуючих чинників, проте позитивний вплив мексикору, стосовно емоксипіну, був вірогідно вищий, починаючи з 3 доби дослідження і до кінця терміну спостереження (табл. 3, 4, рис. 2).

Якщо аналізувати динаміку змін FITC Annexin V-позитивних клітин лейкоцитарної суспензії після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон за умов корекції антиоксидантами, слід зазначити позитивний ефект як мексикору (починаючи з 3 доби), так і емоксипіну (починаючи з 7 доби) на досліджуваній показник, проте він був

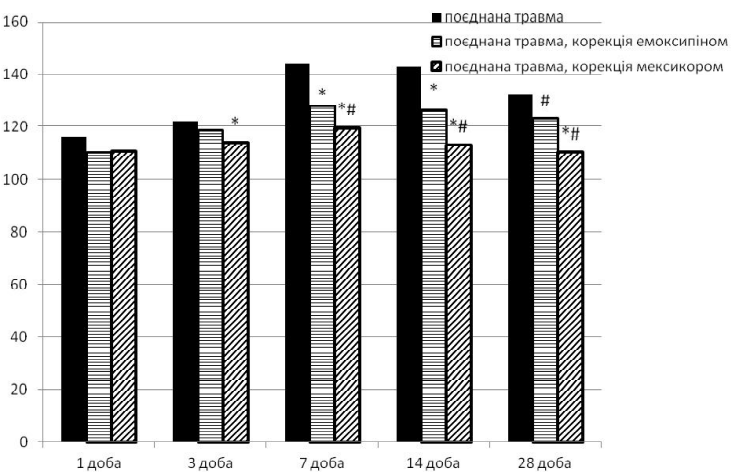


**Рис. 1.** Динаміка змін активних форм кисню клітин лейкоцитарної суспензії (%) після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон і за умов корекції.

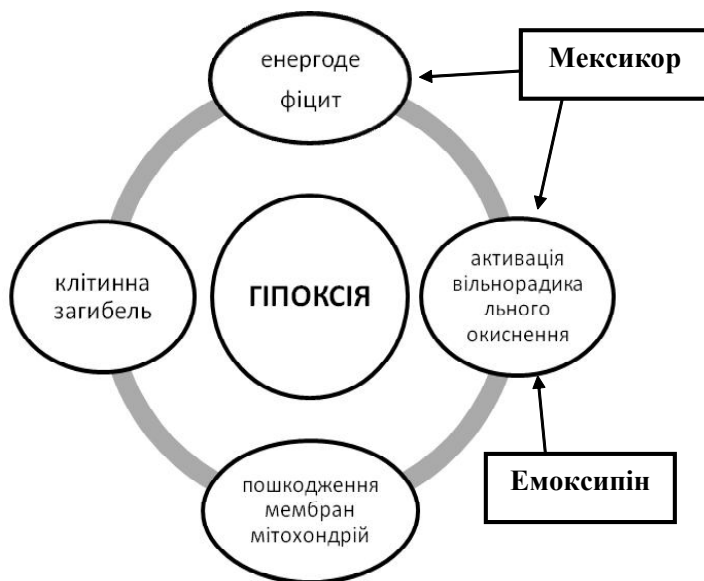
**Примітки:** тут і в наступних рисунках: \* - різниця достовірна у порівнянні з поєднаною травмою, # - різниця достовірна між дослідними групами з корекцією.



**Рис. 2.** Динаміка змін клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом (%) після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон та за умов корекції.



**Рис. 3.** Динаміка змін FITC Annexin V-позитивних клітин лейкоцитарної суспензії (%) після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон і за умов корекції.



**Рис. 4.** Схематичне зображення механізмів апоптичної загибелі лейкоцитів за умови поєднаної травми грудної клітки і стегон та точки для фармакологічного впливу коригуючих чинників.

нижчий проти результатів АФО і трансмембранного потенціалу (табл. 3, 4, рис. 3). Отримані дані настановлюють нас на думку, що в ініціації та реалізації клітинної загибелі після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон, окрім мітохондріального, діють й інші механізми.

Отже, за умови поєднаної травми грудної клітки і стегон розвивається "порочне коло", яке пов'язане з енергодефіцитом [23] і гіперпродукцією вільних радикалів на фоні гіпоксії. У мітохондріях найактивніше продукується супероксид-аніон, який хоч і має дуже короткий період напівжиття, проте у присутності супероксиддисмутази диспропорціонує на кисень і пероксид водню, рівень якого ми встановили за допомогою дихлорфлуоресцеїну діацетату проточною цитометрією. За даними літератури, пероксид водню вступає в реакції Фентона і Хабера-Вейса з вільними іонами феруму і купруму, що супроводжується утворенням надзвичайно токсичних гідроксильних радикалів [16]. Вони є сильними окисдантами біополімерів і ліпідів, індукують процеси ПОЛ, зумовлюючи дезорганізацію мембранних структур, що веде до клітинної загибелі і поглиблення енергодефіциту [16, 19]. Мексикор за рахунок високих пенетраційних властивостей емоксипіну потрапляє в клітину, дисоціюючи у цитозолі на 2 складові, кожна з яких діє самостійно. Перевагою мекси-

кору над іншими цитопротекторами є його здатність прямо підвищувати енергосинтезуючу функцію мітохондрій за рахунок підвищення доставки і споживання сукцинату за умов гіпоксії, реалізації феномену швидкого окиснення бурштинової кислоти сукцинатдегідрогеназою, активації мітохондріального дихального ланцюга, що зумовлює ре синтез АТФ (рис. 4) [4].

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. У посттравматичному періоді після перенесеної поєднаної травми грудної клітки та обох стегон статистично значима гіперпродукція активних форм кисню лейкоцитами вже через 1 добу експерименту зумовлює дезорганізацію біоелектричної активності мембран мітохондрій, що характеризується динамічним зростанням відсотку клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом з максимумом через 7 діб (в 2,6 рази показник вищий контролю,  $p \leq 0,001$ ). Встановлено також динамічне, статистично значуще зростання відсотку лейкоцитів з ознаками апоптозу вже з 1 доби експерименту з найвищими значеннями у період 7-14 доби.

2. При експериментальному відтворенні поєднаної травми грудної клітки та обох стегон виявляється статистично значимий, середньої сили зв'язок між активними формами кисню і вираженістю апоптозу у перші 7 діб та через 28 днів ( $p \leq 0,05$ ), а також достовірну взаємозалежність між рівнем трансмембранного потенціалу і апоптозом через 3 ( $r_{xy} = 0,63$ ) і 7 діб ( $r_{xy} = 0,70$ ).

3. Застосування антиоксидантів у посттравматичному періоді поєднаної травми грудної клітки та обох стегон має позитивний ефект, який характеризується зниженням відсотку активних форм кисню (дія емоксипіну проявляється через 7 і 28 діб, мексикору - вже через 3 дні з максимумом дії через 7 діб). Відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим трансмембранним потенціалом та FITC Annexin V-позитивних клітин лейкоцитарної суспензії зменшується при застосуванні обох коригуючих чинників, проте позитивний вплив мексикору, відносно емоксипіну, є вірогідно вищим.

У перспективі планується дослідити інші шляхи ініціації апоптичної загибелі клітин печінки у посттравматичному періоді поєднаної травми грудної клітки та обох стегон.

### Список літератури

1. Влияние мексикора на окислительный стресс при остром инфаркте миокарда / А. П. Голиков, Б. В. Давыдов, Д. Руднев [и др.] // Кардиология. - 2005. - № 7. - С. 21-26.
2. Заднипрный И. В. Применение антигипоксантов в коррекции антенатальной гипоксии с позиций ее морфо-функциональных особенностей (обзор литературы) / И. В. Заднипрный, Т. П. Сатаева // Журн. клін. та експерим. мед. дослідж. - 2013. - № 1. - С. 13-21.
3. Медикаментозная профилактика реперфузионных повреждений при тромболитической терапии инфаркта миокарда / А. С. Саушев, Г. А. Бояринов, А. А. Усанова [и др.] // Общая реаниматология. - 2010. - № 1. - С. 64-68.
4. Медянка Ю. С. Влияние мексикора на липидный спектр крови у больных стабильной стенокардией напряжения / Ю. С. Медянка //

- Клінічна та експериментальна патологія. - 2011. - Т. 10, № 2 (36). - С. 65-68.
5. Павлов С. В. Вплив тіолових антиоксидантів на вміст стрес-білка HSP70 у гіпокампі монгольських піщанок з гострою ішемією головного мозку / С. В. Павлов // Фармакологія та лікар. токсикологія. - 2012. - № 1 (26). - С. 15-18.
  6. Патент 63997 Україна, МПК G 09 B 23/28. Спосіб моделювання полі травми / Козак Д. В.; заявник і патентовласник Тернопільський державний медичний університет І.Я. Горбачевського. - № U 201104110; заявл. 05.04.11; опубл. 25.10.11; Бюл. 20.
  7. Перепрограммирование энергетического метаболизма митохондрий в злокачественных новообразованиях / А. А. Капля, Л. В. Сорокина, С. В. Хижняк // Український біохімічний журнал - The Ukrainian biochemical journal : наук.-теорет. журн. - 2015. - Т. 87, № 6. - С. 19-35.
  8. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. - М.: Медиасфера, 2003. - 312 с.
  9. Стаценко М. Е. Возможности Мексикора при его использовании в составе комбинированной терапии у больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2-го типа / М. Е. Стаценко, С. В. Туркина, М. А. Косивцова // Клиническая медицина. - 2013. - № 5. - С. 59-64.
  10. Третьякова О. С. Кардиозащита ишемизированного миокарда новорожденных в условиях гипоксии: современные направления / О. С. Третьякова // Ліки України. - 2003. - № 11. - С. 5-10.
  11. Фильченков А. А. Реактиваторы апоптоза как препараты целевой противоопухолевой терапии / А. А. Фильченков // Биомедицинская химия. - 2013. - Т. 59, Вып. 2. - С. 119-143.
  12. Худоб'як М. М. Шляхи корекції вільнорадикального окиснення в ранній посттравматичний період після поєднаної травми грудної клітки і стегон / М. М. Худоб'як // Медична та клінічна хімія. - 2016. - Т. 18, № 1. - С. 108-111.
  13. Широкова А. В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки / А. В. Широкова // Цитология. - 2007. - Т. 49, № 5. - С. 385-394.
  14. Эффективность отечественного миокардиального цитопротектора и его фармакодинамика при острой ишемии миокарда: клинические результаты и экспериментальные модели / В. П. Михин, М. В. Покровский, В. В. Гуреев [и др.] // Российский кардиологический журнал. - 2011. - № 2. - С. 37-42.
  15. Apoptosis of neutrophils / N. A. Maianski, A. N. Maianski, T. W. Kuijpers, D. Roos // Acta Haematol. - 2004. - Vol. 111, № 1-2. - P. 56-66.
  16. Baraboy V. A. Bioantioxidants / V. A. Baraboy - Kiev: Kniga plyus, 2006. - 462 p.
  17. 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.
  18. Gogvadze V. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? / V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky // Trends Cell Biology. - 2008. - № 18(4). - P. 165-173.
  19. Hamanaka R. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signalling and dictate biological outcomes. / R. Hamanaka, S. Chandel // Trends Biochem. Sci. - 2010. - Vol. 35(9). - P. 505-513.
  20. MRC/RCOG Working Party on cervical cerclage. Final report of the Medical Research Council / Royal College of Obstetricians and Gynaecologists multicentre randomised trial of cervical cerclage // British Journal of Obstetrics and Gynaecology. - 2003. - Vol. 100. - P. 516-523.
  21. Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology; ed. E. K. Weir, J. T. Reeve. - New York: Marcel Dekker, 2009. - P. 241-290.
  22. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis / G. Fossati, D. A. Moulding, D. G. Spiller [et al.] // J. Immunol - 2003. - Vol. 170, № 4. - P. 1964-1972.
  23. Violation of cells energy supply as one of the mechanisms of combined trauma of the chest and both thighs in rats and ways of its correction / M. I. Marushchak, M. M. Khudobiak, I. V. Antonyshyn, O. P. Mialiuk // Journal of Education, Health and Sport. - 2017. - Vol. 7(1). - P. 272-283.

**Марущак М.И., Худоб'як М.М., Габор Г.Г., Мялюк О.П.**

#### МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА ПРИ СОЧЕТАННОЙ ТРАВМЕ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ И БЕДЕР, ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Резюме.** Целью нашего исследования было установить особенности апоптоза при сочетанной травме грудной клетки и бедер и обосновать эффективность применения антиоксидантов при данной патологии. Обнаружена статистически значимая гиперпродукция активных форм кислорода лейкоцитами уже через 1 сутки эксперимента, обуславливающей дезорганизацию биоэлектрической активности мембран митохондрий, которая характеризуется динамичным ростом процента клеток лейкоцитарной суспензии с пониженным трансмембранным потенциалом с максимумом через 7 суток (в 2,6 раза показатель выше контроля,  $p \leq 0,001$ ) в посттравматическом периоде после перенесенной сочетанной травмы грудной клетки и обеих бедер. Установлено также динамичный, статистически значимый рост процента лейкоцитов с признаками апоптоза уже с первых суток эксперимента с высокими значениями в период 7-14 суток. Выявлено статистически значимая, средней силы связь между активными формами кислорода и выраженностью апоптоза в первые 7 суток и через 28 дней ( $p \leq 0,05$ ), а также достоверную взаимозависимость между уровнем трансмембранного потенциала и апоптозом через 3 ( $r_{xy} = 0,63$ ) и 7 суток ( $r_{xy} = 0,70$ ). Применение антиоксидантов в посттравматическом периоде сочетанной травмы грудной клетки и обеих бедер имеет положительный эффект, который характеризуется снижением процента активных форм кислорода (действие эмоксипина проявляется через 7 и 28 суток, мексикора - уже через 3 дня с максимумом действия через 7 суток). Процент клеток лейкоцитарной суспензии с пониженным трансмембранным потенциалом и FITC Annexin V-положительных клеток лейкоцитарной суспензии уменьшается при применении обоих средств коррекции, однако положительное влияние мексикора, сравнительно эмоксипина, является достоверно выше.

**Ключевые слова:** сочетанная травма, свободные радикалы, трансмембранный потенциал, апоптоз, коррекция.

**Marushchak M.I., Khudobiak M.M., Gabor G.G., Mialiuk O.P.**

#### MECHANISMS OF MITOCHONDRIAL APOPTOSIS IN COMBINED TRAUMA OF THE CHEST AND HIPS AND JUSTIFICATION OF THE USAGE OF ANTIOXIDANTS IN EXPERIMENT

**Summary.** The aim of our study was to determine the features of apoptosis when there is a combined trauma of the chest and hips

and substantiate the efficacy of antioxidants in this condition. Statistically significant hyperproduction of reactive oxygen leukocytes within 1 day of the experiment, which causes disruption of mitochondrial membrane by bioelectrical activity, characterized by dynamic growth in the percentage of leukocyte cell suspensions with low transmembrane potential of a maximum of 7 days (2.6 times higher than control rate,  $p \leq 0.001$ ) in posttraumatic period after undergoing combined trauma of the chest and both thighs. It was also dynamic, statistically significant increase in the percentage of white blood cells with signs of apoptosis since day 1 of the experiment with the highest values in the period of 7-14 days. Statistically significant average relationship between reactive oxygen and severity of apoptosis in the first 7 days and 28 days ( $r \leq 0.05$ ) and true interdependence between the level of the transmembrane potential and apoptosis through 3 ( $r_{xy} = 0.63$ ) and 7 days ( $r_{xy} = 0.70$ ). The usage of antioxidants in posttraumatic period of combined trauma of the chest and both thighs have the positive effect of decreased percentage of free oxygen radicals (Emoxipin action is evident after 7 and 28 days, Mexicor - starting from 3 days with a maximum action after 7 days). The percentage of cells with low leukocyte suspension transmembrane potential and FITC Annexin V-positive cells leukocyte reduced suspension of the application of the two adjustment factors, but a positive impact Mexicor respect Emoxipin is significantly higher.

**Key words:** combined trauma, free oxygen radicals, transmembrane potential, apoptosis, correction.

Рецензент - д.мед.н., Криницька І.Я.

Стаття надійшла до редакції 29.11.2016 р.

Марущак Марія Іванівна - д.мед.н., доц., зав. кафедри функціональної діагностики та клінічної патофізіології ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського"; +38(097)9981202; marushchak@tdmu.edu.ua

© Мішалов В.Д., Петрошак О.Ю., Хохолева Т.В., Попов В.А.

УДК: 612.12-001.45:340.624

**Мішалов В.Д., Петрошак О.Ю., Хохолева Т.В., Попов В.А.**

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112)

## **ОСОБЛИВОСТІ ДОВГОЇ ТРУБЧАСТОЇ КІСТКИ, СТВОРЕНОЇ ІЗ КОМПЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ, ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Резюме.** З метою проведення експериментальних досліджень в судовій медицині пропонується створення моделі довгої трубчастої кістки із композитних матеріалів та порівняльний аналіз біофізичних властивостей моделі і нативної трубчастої кістки.

**Ключові слова:** судова медицина, імітатори біологічних об'єктів, композитні матеріали.

### **Вступ**

Серед літературних джерел відомі дослідження, що були присвячені кістковій тканині як об'єкту судово-медичної експертизи. Так, В.Г. Донцов [1] проводив дослідження вікових особливостей мікроскопічної будови і мінералізації кісткової тканини плечової кістки, а А.А. Желтиков [2] об'єктом особливостей вікових змін в судово-медичному відношенні обирав ліктьову і плечову кістки.

Н.А. Михеев [3] і І.А. Толмачев [6] за результатами рентгенологічної картини склали судово-медичну характеристику особливостям вогнепальних ушкоджень діафізів довгих трубчастих кісток в аспекті визначення швидкості вогнепального снаряду.

На моделі ізольованої довгої трубчастої кістки В.П. Петров [5] досліджував особливості механізму утворення вогнепальних ушкоджень кінцівок з переломами довгих трубчастих кісток, а Г.А. Пашинян [4] запропонував математичну модель рельєфу твердого піднебіння і її використання при судово-медичній ідентифікації особистості.

За останні 10 років у судовій медицині також відомі роботи, що були присвячені кістковій тканині як об'єкту ідентифікації особи. Так, В.В. Юрасовим [8] вперше запропонований алгоритм дій для встановлення

загальних ознак особи (статевої приналежності, віку і довжини тіла) і на основі результатів аналізу елементного складу кісткової тканини за допомогою лазерного мас-спектрометричного методу встановлений статистично достовірний взаємозв'язок між кількісним елементним складом кісткової тканини конкретної людини і загальними ознаками особи (статевою приналежністю, віком і довжиною тіла). Федулова М.В. [7] у своїй докторській дисертації, на підставі гістологічного і мікроометричного досліджень детально описала вікову динаміку кісткової тканини ребра, епіфізу і діафізу великогомілкової кістки. Автором були знайдені якісні вікові ознаки кісткової тканини, за допомогою яких весь період життя людини можна розділити на інтервали: до 18 років, від 18 до 30 років, від 30 до 50 років і більше 50 років. Можливі шляхи створення моделі довгої трубчастої кістки із композитних матеріалів запропонував О.Ю. Петрошак [9]. Тому актуальним залишається на сьогоднішній день розробка довгої трубчастої кістки із композитних матеріалів для проведення експериментальних досліджень у судовій медицині.

**Мета** дослідження - створити модель довгої трубчастої кістки із композитних (неорганічних компонентів кісткової тканини і штучних полімерних) матеріалів для