

ered as sufficiently studied, however, changes of hemodynamic parameters remain unclear, especially in eyes with high myopia. This study included 58 patients (96 eyes) with high myopia and cataract aged 29-78 years (mean age 55.9±1.8). All patients had standard ophthalmologic examination (autorefractometry, visometry, perimetry, Amsler test, phosphene test, tonometry, biomicroscopy, direct ophthalmoscopy). Additional methods included Nesterov's tonography (to evaluate true intraocular pressure (Po), coefficient of outflow facility (C), rate of aqueous humor production (F) and Bekker coefficient (BC)) and doppler ultrasonography of ocular vessels (ophthalmic artery (OA), central retinal artery (CRA) and short posterior ciliary arteries (sPCA)) performed on a multifunctional ultrasound machine SonoAce-8000 Ex (Madison, South Korea). The following hemodynamic parameters were evaluated: peak systolic velocity Vps (sm/s), mean systolic velocity Vmed (sm/s) and variation in resistivity index (RI) of blood vessels. 6 months after phacoemulsification+IOL there was decrease of true intraocular pressure by 2.58 mmHg associated with elevated coefficient of outflow facility by 0.11 mm³/min per 1 mmHg and elevated rate of aqueous humor production by 0.13 mm³/min. The decrease was also observed in Bekker coefficient by 30.82 points indicating better trophic processes of the eye. The hemodynamic parameters changed too: during this period peak systolic velocity increased by 3.36 cm/sec in the ophthalmic artery, by 3.21 cm/sec in the central retinal artery, and by 2.25 cm/sec in short posterior ciliary arteries.

After the surgery mean systolic velocity of the ophthalmic artery increased by 3.1 cm/sec, central retinal artery – by 2.01 cm/sec, short posterior ciliary arteries – by 2.98 cm/sec. 6 months after the surgery Ri decreased by 0.14 in the ophthalmic artery (0.48 ± 0.006 vs 0.34±0.006), by 0.14 in the central retinal artery (0.47 ± 0.007 vs 0.33±0.007) and by 0.13 in short posterior ciliary arteries (0.47±0.006 vs 0.34±0.006).

Key words: hydrodynamics of the eye, cataract, hemodynamics of the eye, high myopia.

*Рецензент – проф. Безкоровайна І. М.
Стаття надійшла 24.12.2020 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2021-1-159-66-72

УДК 616.89-008.454-001.8-092.9-08:602.9:591.476

Зоренко Є. М., Павлова О. О., Горбач Т. В., Мартинова С. М.

РОЛЬ ГІПОКСІЇ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ У ЩУРІВ, ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ ДАНОГО СТАНУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

zeekmail@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана у межах наукової теми НДР «Патогенез ушкоджуючої дії на організм екзогенних факторів в сучасних умовах», № держ. реєстрації 0115U000991.

Вступ. Хвороба Альцгеймера (ХА) – одне з найпоширеніших нейродегенеративних захворювань у всьому світі. Незважаючи на багаторічне вивчення етіології й патогенезу захворювання, багато аспектів залишаються невивченими. Встановлено, що втрача нейронами здатності саме передавати нервовий імпульс і тягне за собою розвиток нейродегенеративних захворювань, що супроводжуються прогресивною загибеллю нервових клітин. Активну участь в синаптичній передачі й в зростанні аксонів, крім нейромедіаторів, беруть і мітохондрії, тому що дані процеси – енерговитратні.

Відомо, що мітохондрії можуть міняти свою форму та розмір в залежності від умов, в яких вони функціонують, і від активації білків «злиття/поділу», що знаходяться на внутрішній і зовнішній мембрані мітохондрій [1]. Наприклад, при дефіциті глюкози посилюється фрагментація мітохондрій, а при збільшенні в дієті поліненасичених жирних кислот спостерігається підвищене злиття мітохондрій [2, 3]. На таку «мітохондріальну динаміку» особливий вплив мають активні форми кисню, надлишок яких руйнує мембрани мітохондрій, збільшуючи їх розподіл, а на фізіологічному рівні – грають захисну роль для нормаль-

ної підтримки стану мітохондрій і ремодельовання їх крист [4, 5]. У той же час, доведено, що при взаємодії на зовнішній мембрані мітохондрій бета-амілоїду й тау-протеїну з білком Dynamin related protein 1 (DRP1), збільшується експресія DRP1, що тягне за собою активацію фрагментації мітохондрій [6]. Одночасно при таупатіях і гіпоксії замість підвищення поділу мітохондрій утворюються подовжені мітохондрії (mitochondria-on-a-string, MOAS), які не здатні до поділу і функціонують на залишковому принципі [7]. Як надмірна фрагментація мітохондрій, так і нездатність до поділу, в результаті негативно відображається на цілісності крист і окисного фосфорилування [8]. Всі зазначені стани супроводжуються порушенням «аксонального транспорту» мітохондрій, тобто саме їх переміщення по мікротрубочкам аксонів і дендритів [9]. В підсумку, в тканині головного мозку розвивається мітохондріальна дисфункція та енергодефіцит (порушується доставка АТФ до синапсів, не вистачає енергії для зростання аксонів) [10].

Вивчено, що не тільки патологічні білки можуть викликати порушення функції мітохондрій, а й гіпоксія/ішемія. При цьому відзначено зниження окисного фосфорилування і накопичення супероксидних радикалів, які у великій кількості підвищують проникність внутрішньої мембрани і порушують різницю потенціалів мембран мітохондрій [11]. Згодом, мітохондрії набухають, вивільняється цитохром С, протеази, що активують каспази та апоптоз клітин [12]. Врегулювати весь цей процес можуть фосфо-

сфінголіпіди, розташовані на мембранах мітохондрій. Так, один з них – це кардіоліпін, який відповідає за обмін електронів через мембрану мітохондрій, активацію цитохромоксидази С, врегулювання процесів «еліття/поділу» мітохондрій при взаємодії з білками мембран [13]. Таким чином, дефіцит цього «корисного» ліпиду в мітохондріях є предиктором загибелі клітин.

З усього вище викладеного, стає ясно, що дисфункція мітохондрій, гіпоксія, накопичення патологічних білків в нервовій тканині тісно взаємопов'язані між собою й при нейродегенеративних захворюваннях. Однак, які механізми їх взаємозв'язку, що є первинною ланкою, як себе ведуть дані патологічні процеси і чи можуть стовбурові клітини надати позитивний ефект протягом різних періодів захворювання, залишається актуальним питанням.

Мета дослідження – визначення ролі гіпоксії та мітохондріальної дисфункції в механізмах розвитку експериментальної деменції альцгеймерівського типу різного генезу у щурів і можливість корекції даного стану мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Об'єкт і методи дослідження.

1. Тварини та групи

Експеримент був проведений за участю 80 щурів-самців популяції WAG масою 180-250 г, яких розділили на 9 груп (у кожній експериментальній групі по 8 щурів, в контрольній групі-16). Тваринам із штучно нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу внутрішньочеревно протягом 14-ти (гр. Н-14) і 28-и днів (гр. Н-28) вводили водний розчин нітритру натрію в дозі 50 мг/кг [14]. Після ін'єкцій нітритру натрію половина тварин груп НС-14 і НС-28 у відповідний термін отримувала одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) в дозі 500 тис. клітин на кожного щура. Тварини зі скополаміновою моделлю деменції альцгеймерівського типу за відповідною нітритній моделі схемою, отримували внутрішньочеревні ін'єкції скополаміну бутилброміду в дозі 1 мг/кг і внутрішньовенні ін'єкції МСК (гр. СК-14, СК-28, СКС-14, СКС-28) [15]. Тваринам контрольної групи (гр. К) щодня протягом 14 днів і 28 днів внутрішньочеревно вводили по 0,2 мл 0,9% водного розчину натрію хлориду. Всі тварини були розміщені в клітині 41×41×20 см (по 4 щури в кожній клітині) при регульованій температурі 20±2°C і вологості 60±10% в стандартних умовах віварію. Введення щурів з експерименту відбувалося через 14 днів після останнього дня ін'єкцій МСК. Краніальна кров була зібрана, виділяли еритроцити і використовували їх для біохімічних досліджень. Витягували головний мозок, готували 10% гомогенат головного мозку на 0,1 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, який (після центрифугування і відбору супернатанта) використовували для біохімічних досліджень [16].

При роботі з експериментальними тваринами ми керувалися положенням Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 18.03.1986, переглянута і доповнена в 2006 році), Закону України №3447 – IV, ст.26, 31 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», прийнятих П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Комісія з питань етики та біоетики ХНМУ на 8 засіданні 10.10.2018 затвердила, що даний експеримент від-

повідає біоетичним вимогам Директиви ЄС 2010/63/EU про захист тварин, Конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин (ETS123) і не порушує етичних норм в науці і стандартів проведення біомедичних досліджень.

2. Отримання стовбурових клітин

Первинна культура мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) була отримана з кісткового мозку стегнової кістки. Суспензії промивали сольовим розчином Хенкса, центрифугували при 450 g протягом 10 хв і розміщували в колби для культивування ємністю 75 см² при щільності 4x10⁵ клітин/см² в середовищі Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM/F12 (1/1), що містить 2 mM L-глутаміну, 10% фетальну бичачу сироватку (Fetal Bovine Serum, FBS) (SIGMA-ALDRICH, F7524) і 2 μl/ml розчину антибіотика-антимікотика (Antibiotic Antimycotic Solution) (SIGMA-ALDRICH, A5955). Середу з неадгезірованими клітинами відкидали через 24 години культивування, а свіжу середу додавали до адгезірованих фібробластоподібних МСК. Їх культивували при 37°C і 5% CO² на повітрі в CO²-інкубаторі протягом 14 днів, середу міняли кожні 3 дні [17]. Всі реактиви були придбані в SIGMA-ALDRICH (США).

3. Вміст 2,3-дифосфогліцерату (мкмоль/л) визначали за різницею концентрації фосфору в фільтраті безбілкового гемолізату еритроцитів спектрофотометричним методом [18].

4. Вміст ацетилхоліну (мкг/г) і АТФ (мкмоль/г) в гомогенатах головного мозку визначали спектрофотометричним методами [19, 20].

5. Виділення мітохондрій з головного мозку проводили методом диференціального центрифугування [21]. Екстракцію мітохондріальних ліпідів проводили за методом Bligh E. [22]. Поділ ліпідів на фракції проводили методом тонкошарової хроматографії на сілікогелевих пластинах Silufol (Чехія). Для поділу кардіоліпіну і фосфатидної кислоти нами було використано діетиловий ефір (1 система), а також хлороформ/метанол/крижана оцтова кислота/вода в співвідношенні (за обсягом) 80: 25: 8: 0,3 (2 система) [20]. Ліпіди виявляли в парах йоду, ідентифікували шляхом порівняння зі стандартом. Зміст кардіоліпіну (нмоль/мг білка) визначали за методом Bartlett G. [23].

6. Статистичний аналіз.

Оцінка нормальності розподілу вибірки проводилася за допомогою тесту Шапіро-Уілкі. За його результатами нами були використані непараметричні тести для порівняння незалежних груп змінних. Для оцінки відмінностей між п'ятьма незалежними групами в дослідженні був обраний односторонній дисперсійний аналіз Краскела-Уолліса. За ним послідував тест множинних порівнянь Данна. Якщо значення р були нижче 0,05, різниця була статистично значущою. Всі чисельні дані були проаналізовані з використанням GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., Каліфорнія, США) і статистичного пакета для соціальних наук (SSPS).

Результати досліджень та їх обговорення.

Для оцінки ступеня гіпоксії, викликаній введенням нітритру натрію і скополаміном, був використаний такий біохімічний показник, як вміст 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ) – фізіологічного ліганду гемоглобіну, який сприяє звільненню кисню з гемоглобіну

Таблиця 1 – Біохімічні показники енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну у щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу

Біохімічні показники	Група К (контроль), n=16	Група Н-14 (1), n=8	Група НС-14 (2), n=8	Група Н-28 (3), n=8	Група НС-28 (4), n=8
2,3- дифосфогліцерат, мкмоль/мл	3,004±0,064	9,055±0,159 p<0,05 vs гр. К p>0,05 vs гр. 2, 3	3,983±0,136 p<0,05 vs гр. 3 p>0,05 vs гр. К, 1, 4	9,846±0,175 p<0,05 vs гр. К, 2 p>0,05 vs гр. 1, 4	5,838±0,161 p<0,05 vs гр. К p>0,05 vs гр. 1, 2, 3
Ацетилхолін, мкг/г	2,535±0,366	2,167±0,154 p<0,05 vs гр. 2, 4 p>0,05 vs гр. К, 3	3,18±0,11 p<0,05 vs гр. К, 1, 3 p>0,05 vs гр. 4	2,301±0,072 p<0,05 vs гр. 2 p>0,05 vs гр. К, 1, 4	3,083±0,09 p<0,05 vs гр. 1, p>0,05 vs гр. К, 2, 3
АТФ, мкмоль/г тканини	2,826±0,022	2,3±0,014 p<0,05 vs гр. К, 4 p>0,05 vs гр. 2, 3	2,581±0,019 p<0,05 vs гр. 3 p>0,05 vs гр. К, 1, 4	2,029±0,044 p<0,05 vs гр. К, 2, 4 p>0,05 vs гр. 1	2,703±0,019 p<0,05 vs гр. 1, 3 p>0,05 vs гр. К, 2
Кардіоліпін нмоль/мг білка (митохондрий)	51,94±0,13	26,66±0,22 p<0,05 vs гр. К, 2 p>0,05 vs гр. 3, 4	40,4±0,6 p<0,05 vs гр. 1, 3 p>0,05 vs гр. К, 4	21,84±0,22 p<0,05 vs гр. К, 2, 4 p>0,05 vs гр. 1	39,1±0,18 p<0,05 vs гр. 3 p>0,05 vs гр. К, 1, 2

Примітки: Середнє значення±довірчий інтервал (Mean ±Confidence Interval). P<0.05 – різниця між даними значуща (тест Краскела–Уолліса та тест множинних порівнянь Данна).

поблизу тканин, які страждають від дефіциту кисню. Вивчення вмісту 2,3-ДФГ в еритроцитах експериментальних тварин показало, що введення нітриту натрію (в гр. Н-14 і Н-28) супроводжувалося достовірним збільшенням його рівня в еритроцитах щурів гр. Н-28 практично в 3 рази, а в гр. Н-14 – в 2,8 рази в порівнянні з таким у контрольній групі (**табл.1**).

При введенні скополаміну у щурів гр. СК-14 вміст 2,3-ДФГ в еритроцитах, в порівнянні з контролем, істотно не змінився, в той час як в гр. СК-28 рівень 2,3-ДФГ достовірно підвищувався, однак в меншій мірі, ніж після введення нітриту натрію в ті ж самі терміни (**табл.2**).

Аналіз вмісту 2,3-ДФГ в еритроцитах експериментальних тварин показав, що після введення МСК його концентрація в еритроцитах щурів в гр. НС-14, СК-14, СК-28 зменшувалася і практично досягала рівня відповідних показників гр. К, в той же час в гр. НС-28 рівень 2,3-ДФГ знижувався, в порівнянні з гр. Н-28, проте залишався достовірно вище такого в гр. К в 1,9 рази.

Так, в умовах гіпоксії в клітинах і тканинах відбувається нізкоенергетичний зсув в аденіловій системі, тобто знижується інтенсивність енергетичного обміну. Інтегральним показником рівня енергетичного обміну в тканинах є зміст АТФ. Проведені нами дослідження показали, що у тварин з нітрит-індукованою деменцією рівень АТФ в тканині головного мозку щурів достовірно знижувався після 14-денного (в 1,2 рази) і 28-денного (в 1,4 рази) введення нітриту на-

трію, в порівнянні з гр. К. Як видно з отриманих нами даних, введення МСК щурам з гіпоксією, викликаною введенням нітриту натрію, сприяло підвищенню концентрації АТФ в гр. НС-28- практично до рівня гр. К, в той же час в гр. НС-14 – динаміка концентрації АТФ була виражена в меншій мірі.

У щурів зі скополаміновою моделлю рівень АТФ був достовірно нижче, в порівнянні з гр. К, в обох групах, таким чином: в гр. СК-28 – в 1,5 рази, а в гр.СК-14 – в 1,3 рази. Введення МСК щурам зі скополаміновою моделлю практично не дало очікуваних результатів: у щурів гр. СК-14 і СК-28 концентрація АТФ нижче, ніж у щурів контрольної групи.

Також в умовах гіпоксії активується перекисне окислення ліпідів мембран, що призводить до зміни концентрації в них нативних фосфоліпідів. Найважливішим ліпідом мітохондріальних мембран, що грає ключову роль в сполученні роботи окислювальних комплексів дихального ланцюга є кардіоліпін – фосфоліпід внутрішньої мембрани мітохондрій. Вивчення концентрації кардіоліпіну в мітохондріях головного мозку експериментальних щурів показало, що в порівнянні з гр. К, зниження його рівня спостерігалось у всіх групах без ін'єкцій МСК (в найбільшій мірі у щурів гр.Н-28 – в 2,3 рази). Слід зазначити, що у щурів з нітритною моделлю ступінь зниження концентрації кардіоліпіну в мембранах мітохондрій більш виражена, ніж у щурів зі скополаміновою моделлю. Стовбурові клітини достовірно – в 1,5 і 1,8 разів (відповідно) підвищили рівень кардіоліпіну в

Таблиця 2 – Біохімічні показники енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну у щурів зі скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу

Біохімічні показники	Група К (контроль), n=16	Група СК-14 (1), n=8	Група СК-14 (2), n=8	Група СК-28 (3), n=8	Група СК-28 (4), n=8
2,3- дифосфогліцерат, мкмоль/мл	3,004±0,064	3,498±0,081 p>0,05 vs гр. К, 2, 3, 4	3,045±0,081 p<0,05 vs гр. 3, 4 p>0,05 vs гр. К, 1	6,103±0,181 p<0,05 vs гр. К, 2 p>0,05 vs гр. 1, 4	3,938±0,091 p<0,05 vs гр. К, 2 p>0,05 vs гр. 1, 3
Ацетилхолін, мкг/г	2,535±0,366	2,483±0,09 p<0,05 vs гр. 2, 3 p>0,05 vs гр. К, 4	3,074±0,094 p<0,05 vs гр. 1, 3 p>0,05 vs гр. К, 4	1,212±0,198 p<0,05 vs гр. К, 1, 2, 4	2,491±0,067 p<0,05 vs гр. 3 p>0,05 vs гр. К, 1, 4
АТФ, мкмоль/г тканини	2,826±0,022	2,192±0,012 p<0,05 vs гр. К p>0,05 vs гр. 2, 3, 4	2,284±0,016 p<0,05 vs гр. 3 p>0,05 vs гр. К, 1, 4	1,923±0,017 p<0,05 vs гр. К, 2 p>0,05 vs гр. 1, 4	2,237±0,029 p<0,05 vs гр. К p>0,05 vs гр. 1, 2, 3
Кардіоліпін нмоль/мг білка (митохондрий)	51,94±0,13	29,17±0,22 p<0,05 vs гр. К p>0,05 vs гр. 2, 3, 4	29,86±0,19 p<0,05 vs гр. К p>0,05 vs гр. 1, 3, 4	27±0,16 p<0,05 vs гр. К, 4 p>0,05 vs гр. 1, 2	39,02±0,19 p<0,05 vs гр. 3 p>0,05 vs гр. К, 1, 2

Примітки: Середнє значення ± довірчий інтервал (Mean ± Confidence Interval). p<0.05 – різниця між даними значуща (тест Краскела–Уолліса та тест множинних порівнянь Данна).

гр. НС-14 і НС-28, в порівнянні з таким гр. Н-14 і Н-28. У гр. СК-14 рівень кардіоліпіну такий же, як і в гр. СК-14, а в гр. СК-28 – достовірно вище (в 1,4 рази), в порівнянні з гр. СК-28.

Відомо, що на тлі низькоенергетичних зсувів в аденіловій системі може знижуватися синтез і транспорт ацетилхоліну. Аналіз змісту ацетилхоліну в головному мозку щурів після введення нітриту натрію показав деяке зниження рівня ацетилхоліну в гр. Н-14 і Н-28, у порівнянні з таким гр. К. Введення стовбурових клітин призводило до збільшення концентрації ацетилхоліну в головному мозку щурів з нітритною моделлю, при чому в гр. НС-14 його рівень став достовірно вище такого в гр. К.

На скополаміновій моделі (при блокаді М-холінорецепторів) показано, що рівень ацетилхоліну в гр. СК-14 не змінювався, в гр. СК-28- знижувався в 2,1 разів, в порівнянні з таким в гр. К. У той же час рівень ацетилхоліну в гр. СК-14 перевищував, а в гр. СК-28 – практично досягав контрольного рівня гр. К.

Відомо, що ключову роль в прогресуванні хвороби Альцгеймера грає відкладення β -амілоїду в тканині і судинах головного мозку в результаті патологічного розщеплення APP-білка β -секретазою. Багато авторів вважають, що тригером цього патологічного процесу є гіпоксія, викликана судинною дисфункцією [24].

Незважаючи на численні дослідження, присвячені вивченню патогенезу ХА, роль судинних змін сьогодні мало вивчена.

У нашій роботі було використано дві експериментальні моделі деменції альцгеймерівського типу, які мають два різноспрямованих шляхи активації утворення амілоїду. Так, в нітрит-індукованій моделі деменції при взаємодії нітриту натрію і гемоглобіну утворюється метгемоглобін і розвивається гемічна гіпоксія. У той же час, в наших дослідженнях було показано формування дисфункції ендотелію, що супроводжується відкладенням амілоїду субендотеліально, а також загибеллю судин мікроциркуляторного русла [14, 25]. В результаті знижується надходження кисню в головний мозок щурів, тобто розвивається ішемія судинного генезу, що обумовлює енергодефіцит та нейрональну дисфункцію. Аналогічні процеси в кінцевому підсумку, мають місце і в скополамін-індукованій моделі деменції. Однак, в цьому випадку основою розвитку когнітивних порушень є штучно викликаний холінодефіцит, що зменшує синаптичну передачу і сприяє відкладенню амілоїду в тканині і в судинах головного мозку, що доведено в зарубіжних і наших роботах [26, 27]. Звідси впливає питання, чи можуть ці два різноспрямовані патологічні процеси нейродегенерації мати загальні ланки патогенезу?

У нашому експерименті було показано, що тканина головного мозку щурів з нітрит-індукованою експериментальною деменцією підпадала під вплив гіпоксії, про що свідчило достовірно збільшення рівня 2,3-ДФГ. Крім того, між тривалістю курсу введення нітриту натрію і ступенем вираженості гіпоксії була пряма залежність. Схоже гіпоксичне пошкодження, виходячи з рівня 2,3-ДФГ, так само відчував мозок щурів і при тривалому холінодефіциті (скополамін-індукована деменція (гр. СК-28)).

Достовірно зниження рівня ацетилхоліну в тканині головного мозку підтверджує факт наяв-

ності холінодефіциту у щурів гр. СК-28, що не виявляється в нітритній моделі та у щурів гр. СК-14. Відомо, що при блокаді М-холінорецепторів скополаміном ацетилхолін не зв'язується з рецепторами і руйнується ацетилхолінестеразою. Дезактивація М-холінорецепторів (зокрема М1, М3-рецепторів), зниження передачі внутрішньоклітинного сигналу відображується на зниженні активації протеїнкінази С, одного з регуляторів неамілоїдогенного розпаду білка APP [28]. З іншого боку, утворення амілоїду сприяє зниженню синтезу ацетилхоліну з холіну та ацетил-коензиму А, що поставляється мітохондріями [29, 30]. З цього випливає, що при дефіциті ацетилхоліну функція мітохондрій порушується і в нашій роботі підтверджується зниженням синтезу АТФ в тканині головного мозку у щурів після 14 і 28-денного введення скополаміну. Дані результати корелюють з нашими минулими результатами, де у щурів зі скополамін-індукованою експериментальною деменцією розвивався локальний гіпотиреоїдизм і зниження синтезу АТФ, призводячи до загибелі нейронів [27]. В даному випадку порушення окисного фосфорилування може бути пов'язано як з дефіцитом кисню в тканині головного мозку у щурів гр.СК-14, СК-28, так і зі зниженням кардіоліпіну – основного фосфоліпіда, що регулює транспорт електронів через мембрану мітохондрій, що призводить до порушення дихального ланцюга і негативно відзначається на синтезі АТФ. Пошкодження мембран мітохондрій в скополаміновій моделі може бути пов'язано і з скополамін-індукованим окислювальним стресом, зменшенням синтезу білків Nrf2 і HO-1, що відповідають за підтримання окислювально-відновного балансу [31]. Можна припустити, що блокада М-холінорецепторів скополаміном активує патологічний розщеплення APP-білка і окислювальний стрес, тим самим порушуючи функцію мітохондрій. В результаті пошкодження мітохондрій розвивається гіпоксія мозкових структур, що супроводжується збільшенням 2,3-ДФГ (фізіологічного ліганду гемоглобіну).

На нітритній моделі, в умовах дефіциту кисню, обумовленого утворенням метгемоглобіну і судинною дисфункцією, недостатній синтез АТФ в тканині головного мозку можна легко пояснити. Згідно з результатами дослідження Suzanne M. de la Monte та ін., під дією стрептозоцину, схожого за будовою з нітрозамінами, похідними нітриту натрію, знижується експресія рецепторів інсуліну, що тягне за собою порушення енергетичного обміну, мітохондріальну дисфункцію та активацію перекисного окислення ліпідів в тканині головного мозку [32]. Можливо й при нітритному навантаженні концентрація фосфоліпідів, в тому числі і кардіоліпіну мітохондріальних мембран мозку щурів, різко, в більшій мірі, ніж після введення скополаміну, знижується, відображаючи більш виражене пошкодження мембран мітохондрій у щурів з нітрит-індукованою деменцією.

Внутрішньовенне введення МСК супроводжується зміною рівня 2,3-ДФГ в еритроцитах у всіх експериментальних групах і відображає відновлення оксигенації. При цьому, чим більш тривалий вплив нітриту натрію на організм експериментальних тварин (28-днів), тим менш виражені процеси відновлення оксигенації, що, мабуть, пов'язано зі значним вихідним пошкодженням еритроцитів.

Введення МСК позитивно впливало на холінергічну систему, збільшуючи вміст ацетилхоліну, покращуючи нейросинаптичну передачу і мітохондріальну функцію, що відображалось і на відновленні вироблення АТФ. За нашими даними, у щурів зі скополаміновою моделлю деменції дефіцит ацетилхоліну поповнюється в більшій мірі, ніж у тварин з нітритною моделлю.

Однак пошкоджена внутрішня мембрана мітохондрій, де міститься кардіоліпін, після введення МСК все ж повністю не відновлювалася, можливо з цим і пов'язано неповне відновлення функції нейронів. Слід зазначити, що в інших експериментальних роботах у тварин зі скополаміновою моделлю деменції введення стовбурових клітин, крім підвищення рівня ацетилхоліну, супроводжувалося і збільшенням синтезу ростових факторів, зменшенням вмісту прозапальних цитокінів, поліпшенням когнітивних функцій [33, 34].

Висновки.

1. У тварин з нітритною моделлю деменції гемічна гіпоксія є визначальним фактором порушення функцій мітохондрій.

2. При скополаміновій моделі гіпоксичне пошкодження тканини головного мозку є результатом активації амілоїдом окислювального стресу, зниження

концентрації кардіоліпину і, як наслідок, зниження рівня окисного фосфорилування.

3. Загальною ланкою в механізмах пошкодження мозку щурів як при нітритній, так і скополаміновій моделі деменції, є мітохондріальна дисфункція, яка розвивається внаслідок пошкодження ендотелію судин: нітритного пошкодження – при нітритній моделі і опосередкованого амілоїдом і вільнорадикального – при скополаміновій моделі відповідно.

4. Корекція гіпоксії та мітохондріальної дисфункції при експериментальній деменції альцгеймерівського типу різного генезу є можливою за допомогою внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин, однак в нашому дослідженні повного відновлення мембран мітохондрій не спостерігалось.

Перспективи подальших досліджень.

Нами планується подальше більш детальне вивчення особливостей енергетичного обміну в головному мозку щурів з експериментальною деменцією альцгеймерівського типу різного генезу за вмістом сфінголіпідів в мітохондріях та інших відповідних показників в гомогенатах головного мозку, отриманих в різні терміни експерименту (зразу після завершення ін'єкцій нітриту натрію, скополаміну та мезенхімальних стовбурових клітин, через тиждень і т.д.).

Література

- Flannery PJ, Trushina E. Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*. 2019;98:109–20.
- Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol*. 2015;6:109.
- Lionetti L, Mollica MP, Donizzetti I, Gifuni G, Sica R, Pignalosa A, et al. High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. *PLoS One*. 2014;9(3):e92753.
- Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: A mini review. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8590578.
- Cid-Castro C, Hernández-Espinosa DR, Morán J. ROS as regulators of mitochondrial dynamics in neurons. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(5):995–1007.
- Manczak M, Kandimalla R, Fry D, Sesaki H, Reddy PH. Protective effects of reduced dynamin-related protein 1 against amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2016;25(23):5148–66.
- Zhang L, Trushin S, Christensen TA, Bachmeier BV, Gateno B, Schroeder A, et al. Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease. *Sci Rep*. 2016;6:18725.
- Darshi M, Mendiola VL, Mackey MR, Murphy AN, Koller A, Perkins GA, et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem*. 2011;286(4):2918–32.
- Cai Q, Tammineni P. Mitochondrial aspects of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1087–103.
- Lin M-Y, Sheng Z-H. Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp Cell Res*. 2015;334(1):35–44.
- Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6.7):1171–7.
- Ham PB, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol*. 2017;157:92–116.
- Joshi AS, Thompson MN, Fei N, Hüttemann M, Greenberg ML. Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Biol Chem*. 2012;287(21):17589–97.
- Nikolayeva OV, Pavlova OO, Lukyanova YM, Gubina-Vakulik GI, Gorbach TV, vynakhid. KHNMU, patentovlasnyk. Sposib modelyuvannya dementsiyi altsgeymerivskogo typu sudynnogo pokhodzhennya u shchuriv. Patent Ukrainy № 141759. 2020 Kvit 27. [in Ukrainian].
- Dejko R, Shtrigol S, Laryanovskaya Y, Gorbach TV, Gubina-Vakulik G, Devyatkina N, et al. Chronic blockade of central muscarinic receptors in rats reproduces primary pathogenetic links of Alzheimer's disease. *Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny*. 2017;17(3):13-25. [in Ukrainian].
- Meshkova NP. *Praktykum po byokhymii*. M.: yzdatelstvo moskovskogo unyversyteta; 1979. 430 s. [in Russian].
- Pyatikop V, Msallam MA Jr, Shchegelskaya E, Kutovoy I, Gubina-Vakulik G. Migration features of labeled bone marrow mesenchymal stem cells in rats with modeled Parkinson-like syndrome. *Ukrayin neyrokhirurhichnyy zhurnal*. 2014;3:42–8. [in Ukrainian].
- Mranova YS. *Opredelenyie 2,3 DFG y ATF v erytrotsyakh*. *Laboratornoe delo*. 1975;7:652–654. [in Russian].
- Trubysyna YE, Drozdov VN, Lazebnyk LB, Lychkova AE, izobretatel'. *Sposob opredelenyya atsetylkholyna*. Patent Rosii № 2256920. 2003 Sent 15. [in Russian].
- Prokhorova MY. *Metody byokhymicheskyykh yssledovanyy (lypydnyy y energetycheskyy obmen)*. Leningrad: Yzdatelstvo Leningrad unyversyteta; 1982. 272 s. [in Russian].
- Lemeshko VV. *Mitokhondrii. Akkumulyatsiya energii i regulyatsiya fermentativnykh protsessov*. Moskva: Nauka; 1977. Chast' 1, Sokhranennye funktsionalnoy aktyvnosti mytokhondriy pry glubokom zamorazhyvanii; s. 5-11. [in Russian].
- Blygh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911–7.
- Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*. 1959;234(3):466–8.
- Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2017;140(4):536–49.
- Lukyanova YM. Influence of chronic administration of sodium nitrite on morphofunctional state of brain in rats. *Ukr ž med biol ta sportu*. 2019;4(6):52–9. [in Ukrainian].
- Grette Lydon R. *Neurotransmitters and Neuromodulators*. CRC Press; 2020. Chapter 10, Cholinergic neurons and memory: An historical perspective and overview of current research; p. 197–232.

27. Gorbach TV, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Shcholok TS, Onikova AO. Levels of thyroid hormones and indices of energy metabolism in the cerebral cortex of rats with experimental Alzheimer's disease. *Neurophysiology*. 2018;50(3):159–65.
28. Beach TG, Kuo Y-M, Spiegel K, Emmerling MR, Sue LI, Kokjohn K, et al. The cholinergic deficit coincides with A β deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(4):308–13.
29. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacol*. 2016;14(1):101–15.
30. Grimaldi M, Marino SD, Florenzano F, Ciotta MT, Nori SL, Rodriguez M, et al. β -Amyloid-acetylcholine molecular interaction: new role of cholinergic mediators in anti-Alzheimer therapy? *Future Med Chem*. 2016;8(11):1179–89.
31. Muhammad T, Ali T, Ikram M, Khan A, Alam SI, Kim MO. Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/ neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2019;14(2):278–94.
32. de la Monte SM, Tong M. Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: potential relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2009;17(4):817–25.
33. Safar MM, Arab HH, Rizk SM, El-Maraghy SA. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells protect against scopolamine-induced Alzheimer-like pathological aberrations. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1403–18.
34. Qin C, Lu Y, Wang K, Bai L, Shi G, Huang Y, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells improves cognitive deficits and alleviates neuropathology in animal models of Alzheimer's disease: a meta-analytic review on potential mechanisms. *Transl Neurodegener*. 2020;9(1):20.

РОЛЬ ГІПОКСІЇ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ У ЩУРІВ, ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ ДАНОГО СТАНУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

Зоренко Є. М., Павлова О. О., Горбач Т. В., Мартинова С. М.

Резюме. Відомо, що порушення синаптичної передачі імпульсів лежить в основі багатьох нейродегенеративних захворювань, в том числі при хворобі Альцгеймера. Доказано, що ключову роль в синаптичній дисфункції відіграють не тільки амілоїдні бляшки, але й гіпоксія та порушення функції мітохондрій. Водночас, яку роль в механізмі виникнення деменції альцгеймерівського типу різного походження відіграють ці фактори – мало відомо.

Мета дослідження: визначення ролі гіпоксії та мітохондріальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу різного генезу у щурів, а також можливості корекції даного стану мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Об'єкт і методи дослідження. 32 щура-самця популяції WAG масою 180-250 гр (n=8 в кожній групі) впродовж 14 та 28 днів отримували внутрішньочеревні ін'єкції водного розчину нітриту натрію в дозі 50 мг/кг (групи Н-14, Н-28 зі нітрит-індукованою деменцією), а також розчин скополаміна бутілброміду в дозі 1 мг/кг (групи СК-14, СК-28 зі скополамін-індукованою деменцією). Інші 32-щура-самця груп НС-14, НС-28, СК-14, СК-28 отримували внутрішньовенно мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) після закінчення ін'єкцій нітриту натрію та скополаміну. Щури групи контролю (гр. К, n=16) отримували ін'єкції фізіологічного розчину за тією ж схемою. З експерименту щурів виводили через 14 днів після останньої ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин. Концентрацію 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах крові (2,3-ДФГ, мкмоль/л), ацетилхоліну (АХ, мкг/г) й АТФ (мкмоль/г) – в гомогенатах головного мозку (ГМ), кардіоліпіну (нмоль/мг білка) – в мітохондріях ГМ визначали спектрофотометрично.

Результати. Рівень 2,3-ДФГ (нітритна модель) дозозалежно був збільшеним у щурів гр.Н-14, Н-28, в той час як у щурів зі скополамін-індукованою деменцією збільшення цього показника вдвічі спостерігалось тільки в гр. СК-28 в порівнянні з гр. К, але було менш виразним, ніж в гр. Н-28. Концентрація АТФ та кардіоліпіну в усіх експериментальних групах була зниженою в порівнянні з гр.К, проте слід відзначити, що в гр. Н-14, Н-28 вміст кардіоліпіну в мітохондріях був значно нижче, ніж в гр.СК-14, СК-28. Рівень АХ в гр. Н-14, Н-28, СК-14 майже не змінювався, в той час як в гр. СК-28 був зниженим максимально в порівнянні з таким в гр. К. Введення МСК сприяло поліпшенню енергетичного обміну, зниженню рівня гіпоксії, нормалізації рівня АХ, але рівень кардіоліпіну не відновлювався до контрольного рівня.

Висновки. Загальним фактором патогенезу в умовах обох досліджуваних моделей була мітохондріальна дисфункція. Початковим фактором порушення функцій мітохондрій в нітритній моделі була гемічна гіпоксія та ендотеліальна дисфункція, а в скополаміновій – дефіцит ацетилхоліну з подальшим відкладенням амілоїду в тканині та судинах. Корекція деменції альцгеймерівського типу різного генезу можлива за допомогою мезенхімальних стовбурових клітин, внутрішньовенне введення яких загалом сприяло поліпшенню функцій мітохондрій, але без повного їх відновлення.

Ключові слова: деменція, гіпоксія, мітохондрії, стовбурові клітини, щури.

ROLE OF HYPOXIA AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE MECHANISM OF THE EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S TYPE DEMENTIA INDUCED BY DIFFERENT WAYS IN RATS AND ASSESSMENT OF POSSIBILITIES TO CORRECT THIS CONDITION BY USING MESENCHYMAL STEM CELLS

Zorenko Y. M., Pavlova O. O., Gorbach T. V., Martynova S. M.

Abstract. Introduction. It is known that the synaptic dysfunction a key to many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. It has been shown that not only amyloid plaques but also hypoxia and mitochondrial dysfunction are crucial for the synaptic dysfunction. At the same time, it is poorly known the role of these factors in the mechanisms of Alzheimer's type dementia of various origins. **The aim of the study:** to determinate the role of hypoxia and mitochondrial dysfunction in the mechanisms of the experimental Alzheimer's type dementia development induced by different ways in rats, as well as the possibility of correction of this condition by mesenchymal stem cells. **Materials and methods.** 32 male WAG rats weighing 180-250 g (n=8 in each group) for 14 and 28 days received intraperitoneal injections of an aqueous solution of sodium nitrite at a dose of 50 mg/kg (gr. N-14, N-28

with nitrite-induced dementia) and a solution of scopolamine butylbromide at a dose of 1 mg/kg (gr. SC-14, SC-28 with scopolamine-induced dementia). Other 32 male rats of gr. NS-14, NS-28, SCS-14, SCS-28 were intravenously administered with mesenchymal stem cells (MSCs) after injections of sodium nitrite and scopolamine. Control rats (gr. C, n=16) received sodium chloride injections according to the same experimental design. Rats were sacrificed 14 days after the last injection of MSCs. The concentration of 2,3-diphosphoglycerate in blood erythrocytes (2,3-DPG, $\mu\text{mol/l}$), acetylcholine (ACh, $\mu\text{g/g}$) and ATP ($\mu\text{mol/g}$) - in brain homogenates, cardiolipin (nmol/mg protein) - in mitochondria of brain tissue were determined by using spectrophotometer. **Results.** The level of 2,3-DPG (nitrite model) was dose-dependently increased in rats gr. N-14, N-28. In rats with scopolamine-induced dementia, an increase in this indicator was observed only twice in gr. SC-28 in comparison with gr. C, but was less pronounced than in gr. N-28. The ATP and cardiolipin concentration in all experimental groups was reduced compared to gr. C. It should be noted that in gr. N-14, N-28 the cardiolipin content in mitochondria was significantly lower than in gr. SC-14, SC-28. The ACh level in gr. N-14, N-28, SC-14 almost did not change, while in gr. SC-28 was reduced as much as possible compared to that in gr. C. The introduction of MSCs improved energy metabolism, reduced hypoxia, normalized the ACh level, but the cardiolipin content was not restored to the control level. **Conclusions.** A common factor in the pathogenesis of both studied models was mitochondrial dysfunction. The initial factor of mitochondrial dysfunction in the nitrite model was hemic hypoxia and endothelial dysfunction, and in scopolamine - acetylcholine deficiency with subsequent amyloid deposition in brain tissue and blood vessels. Correction of Alzheimer's type dementia of various genesis is possible with the mesenchymal stem cells introduction. Intravenous administration of MSCs improved mitochondrial function, but without their full recovery.

Key words: dementia, hypoxia, mitochondria, stem cells, rats.

*Рецензент – проф. Литвиненко Н. В.
Стаття надійшла 29.12.2020 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2021-1-159-72-76

УДК 612.014.464

Юффе О. Ю., Кіндзер С. Л., Галига Т. М., Діброва Ю. А., Кривопустов М. С.

ДОСВІД ЗАСТОСУВАННЯ ГІДРОАКТИВНИХ ПОВ'ЯЗОК В ЛІКУВАННІ СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)

yurij.dibrova@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Роботу було виконано згідно НДР «Оцінити ефективність імплементації програми ERAS в абдомінальній хірургії та в хірургічному лікуванні метаболічного синдрому», № державної реєстрації 0121U107783.

Вступ. Цукровий діабет – поліетіологічне захворювання і фактори які сприяють розвитку його ускладнень, потребують використання всіх сучасних профілактичних, діагностичних та лікувальних заходів [1, 2]. Кількість хворих на ЦД у світі неухильно зростає і за прогнозами у 2030 році може сягнути 552 млн [3]. Одним із тяжких ускладнень діабету є синдром діабетичної стопи (СДС) – це специфічний симптомокомплекс, основою патогенезу якого є діабетичні мікро- та макроангіопатії, периферична нейропатія нижніх кінцівок, а також остеоартропатія як в ізольованому, так і в поєднаному варіантах. Ці процеси розвиваються паралельно, взаємно обтяжуючи один одного, з приєднанням тяжких гнійно-некротичних уражень, які характеризуються особливим складом мікрофлори і перебігають на тлі глибоких обмінних порушень та імуносупресії. Ризик виникнення гангрен нижніх кінцівок у цих хворих у 20 разів вищий, ніж у загальній популяції [4, 5, 6, 7]. На думку більшості авторів, в лікуванні пацієнтів з СДС слід застосовувати принципи мультидисциплінарного підходу. А саме такі як: необхідно залучати ендокринолога, хірурга відділення гнійної хірургії, судинних хірургів, ортопедів-травматологів та спеціально навчений середній медичний персонал. При цьому слід враховувати, що лікувальна тактика визначається формою

захворювання [8, 9, 10]. Окрім цього, останнім часом широко обговорюються не лише клінічні, але й соціально-економічні аспекти профілактики та лікування даного ускладнення цукрового діабету, методи клініко-економічного аналізу та, перш за все облік всіх затрат, пов'язаних з лікуванням [11, 12]. Сучасні методи лікування не завжди дають змогу успішно вирішити дану проблему. Це, в свою чергу, спонукає до пошуку та розробки нових, зокрема специфічних засобів лікування [13].

Мета дослідження – поліпшити результати лікування хворих з гнійно-некротичними ускладненнями цукрового діабету, шляхом застосування гідроактивних пов'язок у лікуванні синдрому діабетичної стопи.

Об'єкт і методи дослідження. Протягом 2016–2019 р. в клініці проліковано 628 хворих на цукровий діабет (ЦД) з різними формами СДС. Вік пацієнтів коливався від 39 до 87 років (середній вік 63 р.). Середня тривалість захворювання на ЦД становила $15,7 \pm 4,7$ років. Чоловіків було 299, жінок 329. В 74 (11,8%) хворих мав місце ЦД I типу, в 554 (83,4%) хворих – ЦД II типу, в 30 (4,8%) хворих мав місце вперше виявлений діабет.

Для дослідження обрано досліджувану та порівняльну групи з нейропатичною та змішаною формою СДС, в які увійшли хворі з флегмоною стопи та флегмоною стопи в поєднанні з остеоартропатією та гнійно-некротичними ранами на стопі після хірургічного лікування з приводу флегмони, яке було проведено в інших лікувальних закладах. Досліджувану групу склали 87 хворих, порівняльну 96, які були співставні за віком, статтю, тривалістю та тяжкістю перебігу ЦД і