



УДК 616.379-008.64-07:616.115.34-07

КОМПЛЕКСНЕ МОРФОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФНОЯДЕРНИХ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

I. В. Бродяк, А. Р. Гнатуш, Н. О. Сибірня

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: brodyak_irynd@yahoo.com

Представлено результати дослідження морфометричних характеристик нейтрофілів крові щурів з експериментальним цукровим діабетом, а також на фоні введення L-аргініну та аміногуанідину. При експериментальному цукровому діабеті розмір нейтрофілів становив від 10 до 14 мкм, тоді як після введення досліджуваних речовин він знижувався до 9 мкм. Екзогенний L-аргінін та аміногуанідин у тварин з експериментальним діабетом проявили позитивний коригуючий ефект щодо регуляторних і резервних характеристик мембран нейтрофілів. Встановлені істотні розходження в розмірі нейтрофілів периферичної крові тварин зі стрептозотоциновим діабетом можуть бути об'єктивними критеріями для діагностики цього захворювання та прогностичної оцінки під час лікування досліджуваного патологічного стану.

Ключові слова: поліморфноядерні нейтрофільні гранулоцити, експериментальний цукровий діабет, L-аргінін, аміногуанідин.

COMPREHENSIVE MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF BLOOD POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHIL GRANULOCYTES UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

I. V. Brodiak, A. R. Hnatush, N. O. Sybirna

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hryshevskyi St., Lviv 79005, Ukraine*

The results of investigation of morphological peculiarities of neutrophils in blood of rats with experimental diabetes mellitus (EDM) caused by L-arginine and

aminoguanidine are presented. Neutrophils' size under EDM was from 10 to 14 μm , but their size decreased to 9 μm after the administration of L-arginine and aminoguanidine. It should be noted that under EDM the regulatory properties and reserve potential of the cytoplasmic membranes of neutrophils displayed positive effect caused by L-arginine and aminoguanidine. Substantial inconsistency in peripheral blood neutrophil size in rats with streptozotocin diabetes was established. These parameters may serve as objective diagnostic criterions of this disease and as prognostically important marker during treatment of this pathological state.

Key words: polymorphonuclear neutrophil granulocytes, experimental diabetes mellitus, L-arginine, aminoguanidine.

ВСТУП

Адгезивні та рухові особливості лейкоцитів крові в мікросудинному руслі залежать від форми, розміру клітин, їхніх властивостей і функціонального стану [3, 6]. Лейкоцити крові проходять через вузькі капіляри завдяки здатності до деформації [12]. Зміна форми клітини відбувається при сталому об'ємі у зв'язку із наявністю в лейкоцитів значного мембранного фонду, який для лімфоцитів у середньому становить 70%, а для поліморфноядерних гранулоцитів – 40%. Деформація лейкоцитів порівняно з еритроцитами відбувається гірше через наявність ядра, більш високу в'язкість цитоплазми (у 2 000 разів) і сферичну форму клітин [6, 8–10].

Враховуючи те, що лейкоцити крові разом із гуморальними факторами беруть активну участь у виникненні імунних і запальних процесів на ендотелії судин при цукровому діабеті, їхній морфофункціональний стан повинен об'єктивно відображати динаміку розвитку судинних ускладнень [1, 2, 7, 19, 24, 25].

Мета нашої роботи полягала у комплексному дослідженні об'єму клітин, площі поверхні, резервних і регуляторних можливостей мембран поліморфноядерних гранулоцитів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД), а також на фоні введення щурам L-аргініну – субстрату NO-синтази, або аміногуанідину (AG) – селективного інгібітора індукцибельної NO-синтази й інгібітора неферментативного глікозилування, а також чинника, здатного попереджувати посттрансляційні модифікації білків за участю пероксинітриду.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 120–140 г. Тваринам забезпечили вільний доступ до їжі та води із перебуванням у стандартних умовах (12-годинна зміна світла і темряви). ЕЦД викликали внутрішньочеревним введенням стрептозоточину фірми „Sigma” (США) дозою 7 мг на 100 г маси тіла [13, 22]. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози у крові, яку визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів „Lachema” (Чехія). В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози 14–16 ммоль/л. Через 72 год з моменту індукції діабету тваринам починали вводити з питною водою L-аргінін („Reanal”, Угорщина) в концентрації 1,25 г/л протягом 14 днів або AG („Sigma”, США) у концентрації 1 г/л протягом 30 днів [4, 5].

Щурів декапітували під ефірним наркозом. Забір крові для отримання лейкоцитів проводили з використанням 3,8% розчину цитрату натрію (кінцеве розведення цитрат натрію:цільна кров = 1:100).

Лейкоцити виділяли з цитратної крові у градієнті густини з використанням GradiSol-G („Aqua-medica”, Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (pH 7,2–7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою 98%.

У камері Горяєва підраховували кількість виділених поліморфноядерних лейкоцитів. Виділені нейтрофіли центрифугували при 1500 об/хв протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину, а тоді концентрацію клітин в осаді доводили до 100–200 тис./мкл.

У подальших дослідженнях використовували таку схему [9, 17]. У пробірки об'ємом 1,5 мл поміщали по 10 мкл концентрованої суспензії поліморфноядерних лейкоцитів. Додавали по 100 мкл одного із розчинів хлориду натрію (0,9%; 0,45%; 0,2%). В 0,45% розчині хлориду натрію клітини інкубували 40 с, 60 с, 5 хв чи 1 год. В 0,2% розчині хлориду натрію клітини інкубували 40 с. Перша пробірка (0,9% розчин хлориду натрію) слугувала контролем. Із інших пробірок після певного проміжку часу інкубації забирали і переносили на предметне скло краплю розведеної суспензії об'ємом 5 мкл. Із цієї краплі виготовляли мазок і фіксували метиловим спиртом. Клітини зафарбовували за Романовським-Гімза. Під світловим мікроскопом при збільшенні 1 350 (окуляр-мікрометр МОВ-1-15*) вимірювали діаметр клітин. Вираховували середній діаметр для 40–50 нейтрофілів на одному мазку. Площу поверхні клітин розраховували за формулою: $S = \pi D^2$.

Порівнюючи розміри клітин в ізотонічному розчині та після 1-годинної інкубації в гіпотонічному розчині, визначали регуляторну здатність клітин. Оцінку проводили за коефіцієнтом, який вираховували як відношення різниці діаметрів до вихідного діаметру клітин:

$$\text{коефіцієнт регуляторної здатності} = (D_{0,45\% (1 \text{ год})} - D_{0,9\%}) / D_{0,9\%}$$

Резервні можливості мембрани визначали за зміною розміру клітин після 40-секундної інкубації в 0,2% розчині хлориду натрію порівняно з вихідною величиною. Розраховували індекс резервної поверхні (відношення площі поверхні лейкоцитів після інкубації до площі поверхні до інкубації). Зменшення індексу є показником дефіциту мембранного фонду.

Отримані результати обробляли статистично, з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Щоби встановити основні відмінності в розмірі нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові при ЕЦД порівняно з контролем, морфометрично досліджували напрям змін у розмірі цих клітин при введенні екзогенного L-аргініну або аміногуанідину.

Залежно від вимірних діаметрів нейтрофілів (у мкм), графічно зображали розподіл клітин у відсотковому відношенні, а отримані дані представляли у вигляді лейкоцитограми (рис. 1).

Нейтрофільні гранулоцити на лейкоцитограмі контрольних щурів утворюють лише один пік із максимальним вмістом клітин розміром 11 мкм. Порівняльний

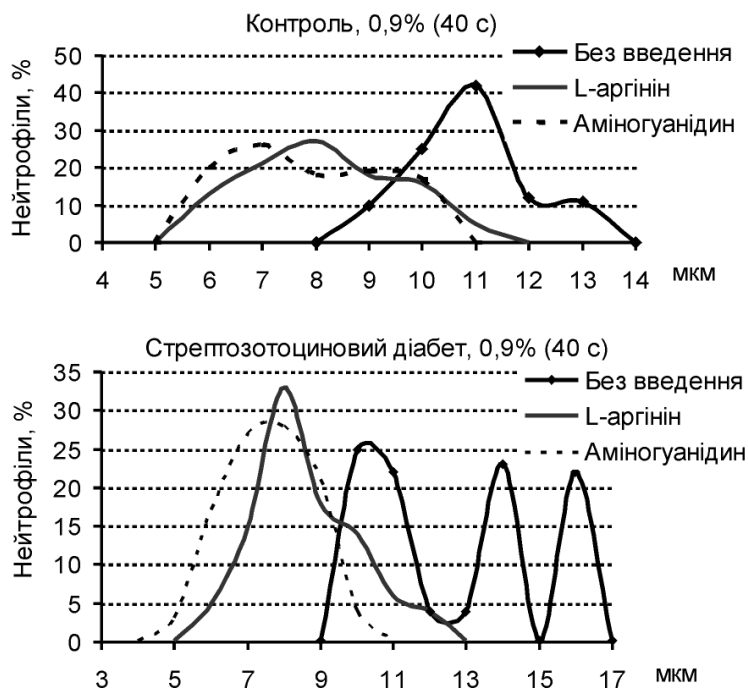


Рис. 1. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на частотний розподіл клітин за розміром (мкм) у популяції нейтрофілів крові контрольних щурів і тварин з експериментальним стрептозотоциновим діабетом

Fig. 1. The influence of L-arginine and aminoguanidine on neutrophil per cent distribution curve (μm) of blood in control rats and of rats with experimental diabetes mellitus

аналіз нейтрофілів крові за умов ЕЦД показав, що для діабету характерна наявність великої кількості (до 27%) клітин, які утворюють три піки: 10 мкм, 14 мкм, 16 мкм. Переважання клітин великого розміру у крові тварин з ЕЦД може опосередковано вказувати на те, що нейтрофіли при даній патології перебувають у субактивованому стані [1, 11, 15].

У контролі та при діабеті лейкоцитограма під впливом L-аргініну мала аналогічний характер із розподілом нейтрофілів від 5 до 13 мкм з високим відсотковим вмістом клітин розміром 8 мкм. На рис. 1 видно, що у контролі на фоні введення аміногуанідину розмір нейтрофілів коливається від 6 до 10 мкм, а у діабеті основну популяцію становлять нейтрофіли з меншим розміром (6–9 мкм). Отже, введення L-аргініну й аміногуанідину щурам з ЕЦД призводило до зростання відсотка поліморфноядерних нейтрофілів невеликого розміру, що може вказувати на появу у периферичній крові молодих, неактивних, функціонально незрілих мієлоїдних клітин [14, 20].

Для дослідження впливу системи L-аргінін/NO на зміни діаметру та площі поліморфноядерних нейтрофільних гранулоцитів крові клітини інкубували у розчинах хлориду натрію різної осмолярності.

У контрольних щурів вивчення динаміки об'єму нейтрофілів показало, що найбільшого розміру клітини досягають через 40 с інкубації в 0,45% розчині хлориду

**Зміна розмірів нейтрофілів,
інкубованих у розчинах хлориду натрію різної осмолярності ($M \pm m$, $n = 8$)
The change of neutrophils' size incubated for different duration in solution
of sodium chloride with low osmolarity**

Параметри	Концентрація розчину, час інкубації клітин					
	0,9%	0,45%, 40 с	0,45%, 60 с	0,45%, 300 с	0,45%, 1 год.	0,2%, 40 с
	Контроль					
Діаметр, мкм	11,1 ± 0,5	12,5 ± 0,6	12,9 ± 0,4*	11,9 ± 0,4*	10,3 ± 0,5	14,1 ± 0,7*
Площа поверхні, мкм ²	389	488	246	248	330	624
	Контроль + L-аргінін					
Діаметр, мкм	8,1 ± 0,4*	9,4 ± 0,5	9,6 ± 0,4	9,5 ± 0,4	8,2 ± 0,3	9,9 ± 0,5*
Площа поверхні, мкм ²	202	274	290	280	207	307
	Контроль + аміногуанідин					
Діаметр, мкм	7,9 ± 0,4*	7,9 ± 0,4	8,4 ± 0,3	8,5 ± 0,4	7,4 ± 0,3	8,6 ± 0,4
Площа поверхні, мкм ²	193	197	221	238	169	234
	Експериментальний цукровий діабет					
Діаметр, мкм	12,5 ± 0,6	13,3 ± 0,6	11,0 ± 0,5	11,4 ± 0,5	11,5 ± 0,5	13,6 ± 0,6
Площа поверхні, мкм ²	492	556	313	410	349	577
	Експериментальний цукровий діабет + L-аргінін					
Діаметр, мкм	8,7 ± 0,5**	9,0 ± 0,3	9,3 ± 0,4	9,8 ± 0,5	9,9 ± 0,5**	8,2 ± 0,4
Площа поверхні, мкм ²	242	261	271	303	305	212
	Експериментальний цукровий діабет + аміногуанідин					
Діаметр, мкм	7,7 ± 0,4**	7,9 ± 0,5	7,7 ± 0,4	8,0 ± 0,3	8,1 ± 0,3	8,4 ± 0,5
Площа поверхні, мкм ²	184	195	185	202	204	221

Примітка: * – різниця достовірна порівняно з контрольними клітинами, інкубованими в 0,9% розчині хлориду натрію;

** – різниця достовірна порівняно з нейтрофілами тварин, хворих на цукровий діабет (інкубація в 0,9% розчині хлориду натрію).

натрію. При збільшенні часу експозиції до 60 с спостерігали зниження досліджуваних клітинних параметрів (див. таблицю). Критерієм функціонального стану нейтрофілів є здатність відновлювати вихідний об'єм після годинної інкубації. На 40-ву секунду інкубації в 0,2% розчині хлориду натрію набухання нейтрофільних гранулоцитів було найбільш вираженим.

Під впливом L-аргінину в нейтрофілів контрольних щурів спостерігається збільшення об'єму починаючи з перших 40 с інкубації в 0,45% розчині хлориду натрію, а стабільного розміру нейтрофільні гранулоцити досягали лише до кінця 60-ї хвилини експозиції; в 0,2% розчині хлориду натрію на фоні введення L-аргінину розмір нейтрофілів зростав на 22% (див. таблицю). Проте морфо-

метричне дослідження нейтрофілів контрольних тварин на фоні введення аміногуанідину показало, що при інкубації клітин у 0,45% та 0,2% розчині хлориду натрію достовірного збільшення об'єму клітин не відбувалося.

За умов експозиції в 0,45% розчині хлориду натрію у морфометрії поліморфноядерних лейкоцитів тварин з експериментальним діабетом зареєстрували незначне збільшення об'єму цих клітин на 40 с. З першої хвилини клітини набували стабільного розміру, який не змінювався до кінця 60-ї хвилини інкубації. В 0,2% розчині хлориду натрію діаметр і площа нейтрофілів зростали лише на 9% (див. таблицю). За умов ЕЦД погіршення резервних можливостей мембран нейтрофільних гранулоцитів крові свідчить про те, що розподіл нейтрофілів певного розміру (від 8 до 18 мкм) змінювався у відсотковому відношенні, але не змінювався їхній середній розмір ($13,3 \pm 0,6$ мкм).

У тварин із діабетом під впливом L-аргініну розмір нейтрофілів у 0,45% розчині хлориду натрію збільшувався лише на п'яту хвилину інкубації, проте цей показник так і не досягав стабільного (вихідного) значення через 1 годину експозиції. При ЕЦД введення аміногуанідину не викликало достовірних змін у діаметрі та площі поліморфноядерних лейкоцитів, інкубованих у 0,45% розчині хлориду натрію (див. таблицю). Під впливом L-аргініну при ЕЦД особливої уваги заслуговують дані про те, що інкубація нейтрофілів у 0,2% розчині хлориду натрію не викликала змін у розмірі клітин, а на фоні дії AG гранулоцити в 0,2% розчині хлориду натрію збільшувалися в розмірі на 9%.

На наступному етапі для оцінки чутливості клітин в гіпотонічному середовищі на фоні введення аргініну й аміногуанідину досліджували морфометричні параметри нейтрофілів і будували лейкоцитограму відсоткового розподілу цих клітин.

У контрольних щурів нейтрофільні гранулоцити, інкубовані в 0,45% розчині хлориду натрію (40 с), утворювали на лейкоцитограмі один пік із високим процентним вмістом клітин розміром 12–13 мкм (рис. 2). На фоні введення L-аргініну поліморфноядерні лейкоцити розподілялися на три піки: основний пік з максимальним розміром 9,5 мкм – відповідає малим нейтрофілам, а два інших відповідають середнім (12 мкм) і великим (14 мкм) клітинам. Введення аміногуанідину викликало ще помітніший зсув кривої вліво до субпопуляції нейтрофілів невеликого розміру. Таким чином, у гіпотонічному розчині чутливість та регуляторні можливості нейтрофілів контрольних тварин, яким вводили L-аргінін і аміногуанідин, поліпшуються порівняно зі значеннями без введення досліджуваних чинників.

Якщо при ЕЦД за умов інкубації у фізіологічному розчині нейтрофіли утворювали три піки (10 мкм, 14 мкм, 16 мкм), то при інкубації клітин у гіпотонічному розчині вони формували два піки (12 мкм і 14 мкм). На фоні впливу L-аргініну і аміногуанідину у хворих тварин лейкоцитограми нейтрофілів, інкубованих у 0,45% розчині хлориду натрію, змістилися вліво. Отже, досліджувані речовини за умов ЕЦД проявили свої протекторні властивості: зменшився розмір нейтрофілів, що може свідчити про перехід клітин із субактивованого у фізіологічний стан.

Порівнюючи розміри клітин в ізотонічному розчині та після інкубації в гіпотонічних розчинах, оцінювали регуляторну здатність і резервні можливості нейтрофілів.

У контролі в клітинах гранулоцитарного ряду за умов введення L-аргініну регуляторні можливості мембран нейтрофілів поліпшувалися, а на фоні впливу аміногуанідину не було виявлено ймовірних змін (рис. 3).

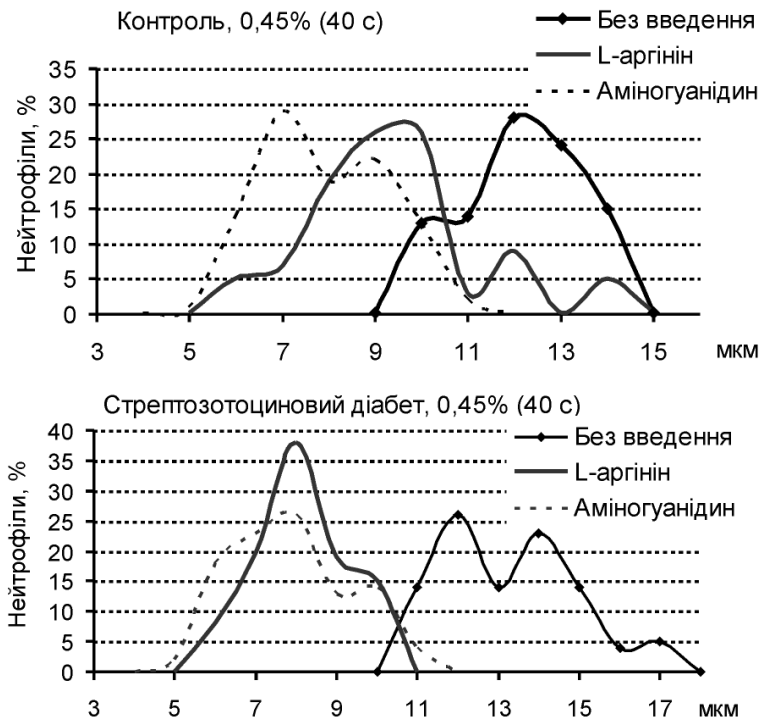


Рис. 2. Вплив L-аргініну і аміногуанідину на частотний розподіл клітин за розміром (мкм) у популяції нейтрофілів крові, інкубованих в 0,45% розчині хлориду натрію, контрольних щурів і тварин з експериментальним стрептозотоциновим діабетом

Fig. 2. The influence of L-arginine and aminoguanidine on neutrophile per cent distribution curve (mkm) of blood in control rats and of rats with experimental diabetes mellitus (neutrophiles were incubated in 0,45% solution of sodium chloride)

Порівнюючи отримані дані за умов ЕЦД з контрольними значеннями, можна стверджувати, що при діабеті порушуються регуляторні можливості мембран нейтрофілів у зв'язку зі зміною осмолярності внутрішнього середовища, яка зумовлена високою концентрацією глюкози у крові [16, 18, 21, 23]. За умов стрептозотоцинового діабету введення L-аргініну і аміногуанідину приводило до поліпшення осморегуляторного статусу клітинних мембран порівняно з діабетом (рис. 3).

За умов введення L-аргініну в клітинах гранулоцитарного ряду контрольних щурів не відбувалося ймовірних змін у резервному фонді, а при введенні аміногуанідину індекс резервних можливостей мембран нейтрофілів знижувався.

При ЕЦД у нейтрофілах виявили достовірне зменшення мембранного резерву порівняно з контролем. Введення L-аргініну викликало зниження індексу резервних можливостей цитоплазматичних мембран цих клітин, проте під впливом АГ досліджувана властивість не зазнавала ймовірних змін. Отже, у тварин з ЕЦД введення досліджуваних речовин викликало позитивний коригуючий ефект на

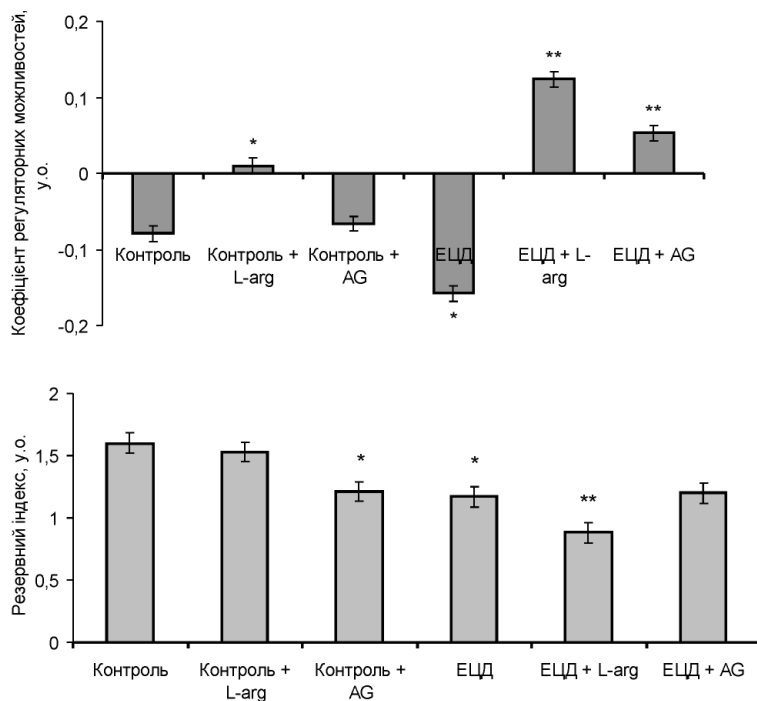


Рис 3. Динаміка змін коефіцієнта регуляторних можливостей та індексу резервних можливостей мембран нейтрофілів у контролі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД), а також на фоні введення L-аргініну (L-arg) або аміногуанідину (AG)

Fig. 3. The dynamics of changes in regulatory properties and reserve capabilities of neutrophil membranes in control and under experimental diabetes mellitus as well as under L-arginine and aminoguanidine administration

регуляторну здатність мембран лейкоцитів крові та привело до незначних змін у резервному фонді мембран цих клітин.

ВИСНОВКИ

1. При морфометричному дослідженні клітин крові щурів з ЕЦД виявлено зростання вмісту в периферичній крові великих нейтрофілів розміром від 14 до 16 мкм, тоді як на фоні введення L-аргініну і аміногуанідину зростав відсоток поліморфноядерних нейтрофільних гранулоцитів невеликого розміру, вказуючи на появу молодих, неактивних гранулоцитарних клітин.
2. Введення екзогенних L-аргініну й аміногуанідину у тварин з експериментальним діабетом виявляло позитивний коригуючий ефект щодо морфологічних і фізико-хімічних характеристик мембран нейтрофілів.
3. Застосована методика дає можливість у комплексі оцінити геометрію клітин, резервні та регуляторні можливості цитоплазматичної мембрани нейтрофілів.

4. Побудована нами лейкоцитограма частотного розподілу нейтрофілів крові за розміром може бути використана як ідентифікатор різних патологічних станів, зокрема цукрового діабету.

1. *Александровский Я.А.* Молекулярные механизмы взаимовлияния патологических процессов при совместном протекании сахарного диабета и рака. Научные и клинические аспекты. **Биохимия**, 2002; 67(12): 1611–1631.
2. *Балаболкин М.И., Клебанова Е.М.* Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета. **Проблемы эндокринологии**, 2000; 46(6): 29–34.
3. *Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н.* Современное представление о роли нейтрофилов в противоопухолевом иммунитете. **Клиническая лабораторная диагностика**, 2005; 8: 51–53.
4. *Бродяк І.В., Сибірна Н.О.* Вплив L–аргініну на активність NO–синтази та процес окисної модифікації білків при стрептозотоциновому діабеті у щурів. **Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія**, 2005; 4: 43–49.
5. *Бродяк І.В., Сибірна Н.О.* Вплив аміногуанідину на процес окисної модифікації білків за умов експериментального цукрового діабету у щурів. **Український біохімічний журнал**, 2006; 78(5): 114–119.
6. *Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю.* Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами. **Иммунология**, 2000; 5: 11–17.
7. *Вербова Н.И., Лебедева Е.А.* Роль гликозилированных продуктов метаболизма в формировании сосудистых осложнений сахарного диабета. **Пробл. эндокринологии**, 1997; 43 (1): 43–46.
8. *Голиков П.П., Лемнев В.Л., Николаева Н.Ю. и др.* Продукция оксида азота лейкоцитами и тромбоцитами периферической крови человека в норме и при сосудистой патологии. **Гематология и трансфузиология**, 2003; 48 (2): 28–32.
9. *Гомоляко І.В., Тумасова К.П.* Ультраструктурна характеристика нейтрофільних гранулоцитів крові у хворих на хронічний холецистит. **Вісник морфології**, 1999; 5 (1): 6–8.
10. *Деев В.А., Тумасова Е.П.* Взаимосвязь между оксидантной и миелопероксидазной активностью нейтрофильных гранулоцитов у гнойно-септических больных. **Лабораторная диагностика**, 1999; 2: 13–15.
11. *Карімов І.З.* Окисна модифікація білків і перекисне окислення ліпідів у розвитку метаболічної інтоксикації при патології. **Лабораторна діагностика**, 2005; 1: 7–13.
12. *Киричук В.Ф., Кошелева Н.А., Ребров А.П.* Роль углеводного компонента гликопротеиновых рецепторов мембран нейтрофилов в изменении их активности у больных острым коронарным синдромом и его сочетанием с сахарным диабетом 2-го типа. **Бюлет. сибирской медицины**, 2002; 2: 40–47.
13. *Колесник Ю.М., Орловский М.А.* Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1. **Проблемы эндокринологии**, 2004; 50(2): 3–10.
14. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П.* Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях. **Биохимия**, 2000; 65(4): 485–503.
15. *Рябов Г.А., Азизов Ю.М., Пасечник И.Н. и др.* Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у больных в критических состояниях. **Вестник интенсивной терапии**, 2002; 4: 4–7.

16. Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М., Коцюруба А.В. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету. **Фізіологічний журнал**, 2005; 51(2): 3–7.
17. Федорова М.З., Левин В.Н. Метод комплексного дослідження геометрії, площини поверхності, резервних можливостей мембрани і осморегуляції лейкоцитів крові. **Клин. лаб. діагностика**, 1997(11): 44–46.
18. Bonnefont-Rousselot D., Bastard J.P., Jaudon M.C., Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. **Diabetes. Metab**, 2000; 26 (3): 163–176.
19. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, 2001; 414(6865): 813–820.
20. Cerchiaro G.A., Scavone C., Texeira S. et al. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin. **Biochemical Pharmacology**, 2001; 62(3): 357–362.
21. Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. **Diabetes Nutr. Metab**, 1999; 12(1): 42–46.
22. Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M. et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, 2000; 43(12): 1528–1533.
23. Birch K.A., Heath W.F., Hermeling R.N. et al. LY290181, an inhibitor of diabetes-induced vascular dysfunction, blocks protein kinase C-stimulated transcriptional activation through inhibition of transcription factor binding to a phorbol response element. **Diabetes**, 1996; 45: 642–650.
24. Gonzalez E., Rosello-Catafau J., Jawerbaum A. et al. Involvement of inducible isoforms of COX and NOS in streptozotocin-pancreatic damage in the rat: interactions between nitridergic and prostanoid pathway. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, 2001; 64(6): 311–316.
25. Inoguchi T., Li P., Umeda F. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, 2000; 49: 1939–1945.

Одержано: 30.04.2008