

УДК 616.831.31-005.4-06:616.379-008.64]-019-092.9

Т.І. Кметь

## ДИНАМІКА РЕАКЦІЇ НЕРВОВИХ ТА ГЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ТІМ'ЯНОЇ ЧАСТКИ КОРИ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ НА ІШЕМІЧНО-РЕПЕРFUЗІЙНЕ ПОШКОДЖЕННЯ В ЩУРІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

**Резюме.** Досліджено динаміку ефектів неповної глобальної ішемії-реперфузії головного мозку на щільність розташування та морфометричні параметри нейро- і гліоцитів кори тім'яної частки головного мозку щурів без цукрового діабету та з наявністю останнього. Встановлено, що в щурів без діабету ішемія знижує щільність розташування нервових та гліальних клітин і підвищує щільність клітин з ознаками апоптозу як після односторонньої реперфузії, так і на 12-ту добу пост-ішемічного періоду. У щурів із цукровим діабетом у

обидва терміни спостереження виявлено зниження щільності розташування тільки нейроцитів на тлі зниження щільності клітин з ознаками апоптозу в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді та суттєвого зростання останнього показника – на 12-ту добу спостереження. Цукровий діабет модифікує також реакцію морфометричних параметрів нервових клітин на ішемію-реперфузію.

**Ключові слова:** головний мозок, ішемія-реперфузія, цукровий діабет, нейрони, глія, апоптоз.

**Вступ.** Цукровий діабет (ЦД) вважається однією з найдраматичніших сторінок світової медицини через значну поширеність, найбільш ранню з усіх захворювань інвалідизацію та високу смертність, що дозволило віднести дане страждання до низки пріоритетних проблем національних систем охорони здоров'я [6]. У свою чергу, найбільш тяжким і частим ускладненням цієї недуги, яке суттєво підвищує летальність хворих, є ішемічно-реперфузійне ураження центральної нервової системи [4, 7, 10].

Вплив діабету на морфофункціональний стан нервових та гліальних клітин тім'яної частки кори великих півкуль головного мозку в ранньому періоді розвитку експериментального діабету (на 4-ту і 17-ту добу) досліджений [2], проте особливості реакції зазначених клітин на ускладнення ЦД ішемією-реперфузією в пізньому (90 діб) терміні формування діабетичної енцефалопатії залишаються невивченими.

Нами показано [1], що неповна глобальна ішемія головного мозку в щурів із ЦД призводить до порушення морфофункціонального стану ендотеліальних клітин судин кори лобової (моторної), тім'яної (соматосенсорної) та скроневі (слухової) часток великих півкуль у різні терміни ішемічно-реперфузійного періоду, що дозволяє очікувати на відповідну реакцію нервових та гліальних клітин за умов такої поєднаної патології.

**Мета дослідження.** Вивчити в динаміці зміни щільності розташування нервових, гліальних та апоптичних клітин неокортексу тім'яної частки великих півкуль та їх морфометричні характеристики в щурів-самців із тримісячним ЦД у ранньому та пізньому періодах ішемічно-реперфузійного пошкодження мозку.

**Матеріал і методи.** Дослідження проведені на 66 нелінійних білих самцях щурів контрольної групи та зі стрептозотин-індукованим ЦД. Останній моделювали одноразовим внутрішньо-

черевним уведенням стрептозотину (Sigma, Aldrich, США) двомісячним тваринам у дозі 60 мг/кг маси тіла [5]. У частини щурів контрольної групи та тих, що мали тримісячний ЦД моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію, для чого під внутрішньочеревним наркозом (каліпсол, 75 мг/кг) переднім середнім шийним доступом виділяли обидві загальні сонні артерії, на які накладали кліпси упродовж 20 хвилин. Після цього кровотік по судинах відновлювали для досягнення реперфузії [3]. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії частину тварин виводили з експерименту через 1 годину після завершення реперфузійного періоду, а відстрочених – на 12-ту добу.

Забій тварин здійснювали під каліпсоловим наркозом. Забирали головний мозок, за координатами стереотаксичного атласу [9] виділяли кору тім'яної частки і фіксували її в 10 % розчині Буена впродовж 24 годин. Після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Зображення кори мозку вивчали в спектрі люмінесценції на флуоресцентному мікроскопі AX-10SKOP (Zeiss, Німеччина) та за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4722 (COHU Inc., США) уводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Морфометричний аналіз клітин тім'яної частки неокортексту здійснювали в автоматичному режимі за допомогою програми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування VIDAS-2,5 (Kontron Elektronik, Німеччина) [8]. Визначали наступні характеристики нервових, гліальних та апоптичних клітин: сумарну (кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup> площі зрізу кори мозку) та відносну (%) щільність розподілу окремих класів клітин, їх площу (мкм<sup>2</sup>), коефіцієнти форми та елонгації.

Експериментальні втручання здійснювали відповідно до основних положень GLP (1981 р.)

Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.; Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Проведено статистичний аналіз числових даних у прикладних програмах "Statistica 6.0" та "SPSS 13" із використанням параметричного t-критерію Стьюдента. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Результати дослідження представлені в таблицях 1 і 2.

Встановлено, що сумарна щільність нервових та гліальних клітин у корі тім'яної частки шурів без ЦД у ранньому постішемичному періоді вірогідно зменшилася в 1,1 та 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) відповідно, при одночасному зростанні щільності апоптичних клітин в 1,6 раза відносно показників у контрольних тварин. Незважаючи на зниження щільності розташування нейронів та глії в даному терміні спостереження, їх відсоткове співвідношення змін не зазнало, однак частка апоптичних клітин зросла на 73 %.

На 12-ту добу спостереження сумарна щільність нейронів зменшилася на 29 % стосовно такої в контрольних шурів і на 22 % – стосовно показника в ранньому терміні дослідження, а сумарна щільність гліальних клітин – на 15 % стосовно показника в контрольних шурів. Ці зміни відбулися на тлі зростання на 102 % щільності апоптичних клітин.

Аналіз відсоткового співвідношення різних класів клітин кори тім'яної частки півкуль головного мозку в пізньому постішемичному терміні дослідження показав достовірне зниження частки нейроцитів на 9 % та зростання частки апоптичних клітин на 145 % і 41 % відповідно щодо показників у контролі та ранньому терміні. Відсоток гліальних клітин вірогідно зріс на 15 % стосовно раннього періоду спостереження. Таким чином, на 12-ту добу постішемичного періоду спостерігалось наростання загибелі нервових клітин кори тім'яної частки півкуль головного мозку, що дає підстави думати про незавершеність процесів апоптозу до кінця даного терміну.

Дослідження морфометричних параметрів різних клітин кори тім'яної частки головного мозку в ранньому постішемичному періоді показало, що площа нервових та апоптично змінених клітин вірогідно зменшилася на 23 % та 40 % відповідно відносно показників у контрольних тварин, тоді як даний показник гліальних клітин в обидва терміни спостереження змін не зазнав. У пізньому ішемічно-реперфузійному періоді площа нейронів зменшилася на 8 % стосовно показників у контрольних шурів та підвищилася на 20 % стосовно раннього терміну спостереження. Площа апоптично змінених клітин у віддаленій термін спостереження зменшилася на 30 % відносно показника в контрольній групі тварин.

У ранньому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку виявлено зниження коефіцієнта форми нервових та гліальних клітин кори тім'яної частки півкуль на 3 % ( $p < 0,01$ ) та 5 % ( $p < 0,05$ ) відповідно щодо показників у контрольних тварин. Коефіцієнт елонгації нейронів у досліджуваному терміні ішемії зменшився на 4 % ( $p < 0,001$ ), а гліоцитів та деструктивно змінених клітин – вірогідних змін не зазнав.

В умовах пізнього ішемічно-реперфузійного періоду достовірно зріс коефіцієнт форми нейроцитів порівняно з таким у попередньому терміні спостереження, апоптичних клітин – на 10 % стосовно контрольної групи тварин та на 20 % – стосовно показника в ранньому терміні дослідження. Даний коефіцієнт гліальних клітин вірогідно зменшився на 4 % щодо контрольної групи тварин. Коефіцієнт елонгації гліо-, нейроцитів та апоптично змінених клітин досліджуваної ділянки кори вірогідно підвищився на 4 %, 10 % та 19 % відповідно стосовно показників у контрольних тварин і на 6 %, 15 % та 26 % – стосовно раннього періоду дослідження.

У шурів із тримісячним ЦД виявлено достовірне зниження сумарної щільності нервових клітин тім'яної частки кори великих півкуль головного мозку на 12 % щодо контрольної групи тварин. Відсоткове співвідношення різних класів клітин кори досліджуваної частки півкуль залишалось на рівні показників контрольної групи тварин.

У ранньому терміні ішемічно-реперфузійного пошкодження досліджуваної зони кори тварин із ЦД виявлено зниження щільності нервових та деструктивно змінених клітин на 11 % і 47 % відповідно відносно показників у шурів із ЦД. У даному періоді спостереження встановлено, що відсоткове співвідношення нейронів та глії змін не зазнало, однак відсоток апоптичних клітин зменшився на 43 % порівняно з діабетичними тваринами.

В умовах пізнього ішемічно-реперфузійного періоду сумарна щільність та відсоткове співвідношення нервових клітин у зазначеній зоні кори тварин із ЦД достовірно зменшилися в 1,3 і 1,2 раза відповідно стосовно показників у тварин із діабетом і в 1,1 та 1,2 раза відповідно стосовно попереднього терміну спостереження. Щільність розміщення та відсоток апоптичних клітин у досліджуваній частці кори півкуль головного мозку навпаки, підвищилась у 3 рази і 3,8 рази відповідно стосовно показників у тварин зі стрептозотцин-індукованим ЦД і в 5,8 та 6,6 рази – стосовно раннього періоду спостереження. Достовірних змін зазначених показників з боку гліальних клітин нами не виявлено.

При дослідженні морфометричних параметрів різних клітин кори тім'яної частки головного мозку встановлено, що площа нейроцитів та апоптичних клітин у шурів із діабетом зменшилася на 16 % і 24 % відповідно відносно показників у контрольних тварин. Проте в ранньому ішемічно-

Таблиця 1

**Щільність різних класів клітин у корі тім'яної частки півкуль шурів зі стрептозотоніндукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (на 1 мм<sup>2</sup>) (M±m)**

Група спостереження	Класи клітин		
	Нервові	Гліальні	Апоптичні
Контроль	$\frac{967,02 \pm 22,87}{67,83 \pm 1,23}$	$\frac{428,67 \pm 19,23}{29,38 \pm 1,13}$	$\frac{39,30 \pm 6,85}{2,79 \pm 0,51}$
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	$\frac{885,49 \pm 18,49^*}{67,991,09}$	$\frac{364,74 \pm 16,42^*}{27,17 \pm 1,04}$	$\frac{64,45 \pm 6,84^*}{4,84 \pm 0,50^*}$
Ішемія-реперфузія (12 діб)	$\frac{695,17 \pm 15,66^{*\wedge}}{61,82 \pm 1,08^{*\wedge}}$	$\frac{365,24 \pm 13,91^*}{31,34 \pm 1,01^\wedge}$	$\frac{79,46 \pm 8,15^*}{6,84 \pm 0,66^{*\wedge}}$
Діабет	$\frac{850,87 \pm 24,17^*}{64,47 \pm 1,22}$	$\frac{425,43 \pm 19,42}{31,34 \pm 1,15}$	$\frac{55,30 \pm 6,76}{4,18 \pm 0,50}$
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	$\frac{757,67 \pm 23,07^\#}{66,44 \pm 1,35}$	$\frac{370,59 \pm 19,87}{31,17 \pm 1,32}$	$\frac{29,10 \pm 5,52^\#}{2,39 \pm 0,47^\#}$
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	$\frac{665,74 \pm 21,23^\#\&}{53,76 \pm 1,47^\#\&}$	$\frac{395,39 \pm 18,99}{30,47 \pm 1,15}$	$\frac{169,14 \pm 14,72^\#\&}{15,78 \pm 1,59^\#\&}$

Примітка. у *чисельнику* – сумарна щільність різних класів клітин на 1 мм<sup>2</sup> тім'яної частки кори; у *знаменнику* – відсоток різних класів клітин; достовірність змін порівняно з: \* - контролем; ^ - ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у контрольних тварин; # - діабетом; & – ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у тварин із діабетом

Таблиця 2

**Морфометричні параметри різних класів клітин у корі тім'яної частки півкуль шурів зі стрептозотоніндукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m)**

Група спостереження	Площа, мкм <sup>2</sup>	Коефіцієнт форми	Коефіцієнт елонгації
Нервові клітини			
Контроль	82,76±1,06	0,781±0,003	0,691±0,003
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	63,76±0,83*	0,764±0,004*	0,665±0,004*
Ішемія-реперфузія (12 діб)	76,60±1,10* <sup>^</sup>	0,783±0,004 <sup>^</sup>	0,763±0,003* <sup>^</sup>
Діабет	69,50±0,99*	0,795±0,004*	0,758±0,004*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	84,53±1,53 <sup>#</sup>	0,789±0,005	0,741±0,004 <sup>#</sup>
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	70,65±1,01 <sup>&amp;</sup>	0,774±0,004 <sup>#&amp;</sup>	0,761±0,003 <sup>&amp;</sup>
Гліальні клітини			
Контроль	19,07±0,19	0,709±0,006	0,672±0,006
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	19,17±0,27	0,678±0,008*	0,655±0,007
Ішемія-реперфузія (12 діб)	19,61±0,25	0,682±0,009*	0,696±0,006* <sup>^</sup>
Діабет	19,16±0,26	0,683±0,008*	0,685±0,007
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	19,50±0,28	0,694±0,009	0,679±0,008
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	19,40±0,23	0,672±0,008	0,690±0,006
Апоптичні клітини			
Контроль	29,67±1,27	0,63±0,01	0,53±0,01
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	18,01±1,28*	0,60±0,03	0,50±0,03
Ішемія-реперфузія (12 діб)	20,92±1,27*	0,70±0,02* <sup>^</sup>	0,63±0,02* <sup>^</sup>
Діабет	22,71±1,51*	0,67±0,02	0,58±0,02
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	21,84±2,75	0,72±0,03	0,65±0,03
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	22,46±1,02	0,72±0,01	0,64±0,01

Примітка. Вірогідність різниці порівняно з: \* – контролем; ^ – ішемією-реперфузією (20 хв/1 год) у контрольних тварин; # – діабетом; & – ішемією-реперфузією (20 хв/1 год) у тварин із діабетом

реперфузійному періоді у тварин із порушенням вуглеводного обміну площа нервових клітин збільшилася на 22 % стосовно тварин із ЦД, а на 12-ту добу даний параметр зменшився на 17 % стосовно раннього терміну спостереження. Вірогідних змін площі гліальних та апоптичних клітин в обидва терміни дослідження не зафіксовано.

За умов стрептозоточин-індукованого діабету коефіцієнт форми нервових клітин вірогідно зріс ( $p < 0,05$ ), а гліальних – зменшився ( $p < 0,05$ ) відносно показника у тварин контрольної групи.

На 12-ту добу постішемичного періоду у тварин із ЦД виявлено достовірне зниження коефіцієнта форми нервових клітин кори тім'яної частки півкуль як щодо показника в шурів із діабетом, так і стосовно раннього терміну спостереження.

Моделювання ЦД супроводжувалося зростанням коефіцієнта елонгації нервових клітин на 10 % порівняно з таким у тварин контрольної групи. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із діабетом даний показник нервових клітин зменшився на 3 % ( $p < 0,05$ ) відносно шурів із діабетом, а на 12-ту добу – зріс на 3 % ( $p < 0,05$ ) стосовно раннього терміну спостереження. Характерно, що морфометричні показники гліальних клітин кори досліджуваної частки півкуль головного мозку тварин із ЦД та при ускладненні останнього ішемією-реперфузією різної тривалості змін не зазнали.

#### Висновки

1. У шурів без цукрового діабету 20-хвилинна каротидна ішемія-реперфузія знижує щільність розташування нервових та гліальних клітин і підвищує щільність апоптичних у корі тім'яної частки головного мозку як після одноденної реперфузії, так і на 12-ту добу спостереження.

2. У тварин із тримісячним експериментальним діабетом в обидва терміни ішемічно-реперфузійного періоду зменшується щільність розташування тільки нервових клітин кори тім'яної частки великих півкуль на тлі зниження щільності клітин з ознаками апоптозу в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді та суттєвого зростання останнього показника – на 12-ту добу спостереження.

3. Цукровий діабет модифікує реакцію морфометричних параметрів нервових клітин на ішемію-реперфузію.

**Перспективи подальших досліджень.** Для поглиблення уяви про регіонарні особливості чутливості кори великих півкуль до ішемії-реперфузії головного мозку в шурів із цукровим діабетом перспективним є вивчення реакції неокортекса інших часток.

#### Література

1. Бойчук Т.Н. Регионарные особенности реакции эндотелиальных клеток различных функциональных отделов коры больших полушарий крыс со стрептозоточин-индуцированным диабетом, осложненным ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга / Т.Н. Бойчук, Т.И. Кметь // Вестн. КазНМУ. – 2013. – № 5 (1). – С. 64-67.
2. Волчегорский И.А. Динамика начальных проявлений экспериментальной диабетической энцефалопатии / И.А. Волчегорский, Л.М. Рассохина, И.Ю. Мирошниченко // Рос. физиол. ж. им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 4. – С. 491-500.
3. Скибо Г.Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г.Г. Скибо // Патология. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 22-30.
4. Модификация функционального состояния инсулиноиммуноположительных клеток тимуса ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга у крыс со стрептозоточин-индуцированным сахарным диабетом / С.С. Ткачук, О.В. Ткачук, А.М. Леньков [и др.] // Вестн. КазНМУ. – 2013. – № 5 (1). – С. 245-247.
5. Bassirat M. Short- and long-term modulation of microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats by glycosylated products / M. Bassirat, Z. Khalil // J. Diabetes Complications. – 2008. – Vol. 22, № 6. – P. 371-376.
6. Chan J.C.N. Diabetes in Asia, epidemiology, risk factors and pathophysiology / J.C.N. Chan, M. Vasanti, J. Weiping [et al.] // J. Amer. Med. Assoc. – 2009. – Vol. 301, № 20. – P. 2129-2140.
7. Idris I. Diabetes mellitus and stroke / I. Idris, G. A. Thomson, J. C. Sharma // Int. J. Clin. Pract. – 2006. – Vol. 60, № 1. – P. 48-56.
8. Kolesnik Y.M. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement / Y.M. Kolesnik, A.V. Abramov // Microscopy and Analysis. – 2002. – № 5. – P. 12-16.
9. König J.F. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem / J.F. König, P.A. Klippel. – Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1963. – 162 p.
10. Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse / R. Kumari, L.B. Willing, J.K. Kredy [et al.] // J. Cereb. Blood Flow. Metabol. – 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 710-718.

### ДИНАМИКА РЕАКЦИИ НЕРВНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ТЕМЕННОЙ ДОЛИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Т.И. Кметь

**Резюме.** Исследованы эффекты неполной глобальной ишемии-реперфузии головного мозга на плотность расположения и морфометрические параметры нейро- и глиоцитов коры теменной доли головного мозга крыс без сахарного диабета и с наличием последнего в динамике. Установлено, что у крыс без диабета ишемия-реперфузия снижает плотность расположения нервных и глиальных клеток и повышает плотность клеток с признаками апоптоза как после односторонней реперфузии, так и на 12-е сутки постшемического периода. У крыс с сахарным диабетом в оба сроки наблюдения выявлено снижение плотности расположения только нейронов на фоне снижения плотности клеток с признаками апоптоза в раннем ишемически-реперфузионном периоде и существенного роста последние

го показателя – на 12-е сутки наблюдения. Сахарный диабет модифицирует также реакцию морфометрических параметров нервных клеток на ишемию-реперфузию.

**Ключевые слова:** головной мозг, ишемия-реперфузия, сахарный диабет, нейроны, глия, апоптоз.

**DYNAMICS OF THE NEURONS AND GLIAL CELLS REACTION OF THE CEREBRAL CORTEX  
PARIETAL LOBE ON ISCHEMIC REPERFUSION INJURY IN RATS WITH DIABETES  
MELLITUS**

*T.I. Kmet*

**Abstract.** The dynamics of the effects of incomplete global ischemia-reperfusion of the brain on the density and morphometric parameters of neurons and glial cells of the parietal lobe of the brain in rats with diabetes mellitus and in rats without diabetes has been studied. It was established that ischemia reduces the density of neurons and glial cells and increases the density of cells with signs of apoptosis in rats without diabetes both after one hour reperfusion and on the 12<sup>th</sup> day of the postischemic period. Reduction in density of neurons only was found in rats with diabetes in both periods of observation against decrease in cell density with signs of early apoptosis in ischemic-reperfusion period and a significant increase in the latter parameter on the 12<sup>th</sup> day of observation. Diabetes also modifies the response of morphometric parameters of neurons in ischemia-reperfusion injury.

**Key words:** brain, ischemia - reperfusion, diabetes, neurons, glia, apoptosis.

Higher State Educational Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University» (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Роговий Ю.С.

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 1 (77). – P. 45-49

Надійшла до редакції 10.11.2015 року