

УДК 611.813.11-018.82/.833:616:379-008.64]-092.9

Т.І. Кметь

Кафедра гігієни та екології (зав. – проф. Л.І. Власик) ВДНЗ України “Буковинський державний медичний університет”, м. Чернівці

ЗМІНИ МОРФОМЕТРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ VCL-2+ НЕРВОВИХ І ГЛІАЛЬНИХ КЛІТИН КОРИ ЛОБОВОЇ ЧАСТКИ ПІВКУЛЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ САМЦІВ-ЩУРІВ ЧЕРЕЗ УСКЛАДНЕННЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ДВОБІЧНОЮ КАРОТИДНОЮ ІШЕМІЄЮ-РЕПЕРФУЗІЄЮ

Резюме. Досліджено вплив ішемії-реперфузії головного мозку на морфометричні параметри Vcl-2⁺ нервових і гліальних клітин кори лобової частки півкуль щурів із цукровим діабетом. Встановлено, що у тварин без порушення вуглеводного обміну двобічна каротидна ішемія-реперфузія порушує морфометричні параметри Vcl-2⁺-гліоцитів кори лобової частки півкуль головного мозку на 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду. У щурів із тримісячним цукровим діабетом змін зазнають морфометричні параметри Vcl-2⁺-нейроцитів. Тримісячний стрептозотоциніндукований діабет модифікує реакцію морфометричних параметрів Vcl-2⁺-нейроцитів кори лобової частки в ранньому терміні спостереження за рахунок змін коефіцієнтів форми та елонгації, у пізньому – за рахунок останнього; реакція гліоцитів модифікована в ранньому терміні за рахунок площі клітин, їх коефіцієнтів форми та елонгації, у пізньому – за рахунок площі.

Ключові слова: цукровий діабет, каротидна ішемія-реперфузія, Vcl-2⁺-нейроцити та гліоцити.

За умов стрімкого зростання захворюваності на цукровий діабет (ЦД), котрий, згідно з даними ВООЗ визнано неінфекційною епідемією [1], вагомим значення набула проблема гострого порушення мозкового кровообігу [2].

Основним чинником, який ініціює каскад патологічних процесів, що спричиняють розвиток діабетичної нейропатії, є хронічна гіперглікемія [3], яка в кінцевому результаті призводить до посилення апоптозу клітин мозку [4]. Регуляція останнього здійснюється переважно за участі білків родини Vcl-2, яка нараховує близько 15 членів. Співвідношення даних протеїнів, а саме: перевага агоністів чи антагоністів сімейства Vcl-2, визначають долю клітини [5].

За результатами експериментальних досліджень встановлено [6, 7], що діабетична гіперглікемія значно посилює апоптоз не тільки нервових, але й гліальних клітин, зокрема астроцитів, за умов церебральної ішемії. Відомі особливості загибелі нейроцитів у корі лобової частки (КЛЧ) півкуль головного мозку і гіпокампа за умов стрептозотоциніндукованого діабету та ішемії [8]. Вивчені морфометричні параметри нервових та гліальних клітин КЛЧ великих півкуль у щурів-самців із ЦД у ранні та пізні періоди ішемічно-реперфузійного пошкодження мозку [9]. Однак не до кінця з'ясовані антиапоптичні механізми за умов комбінованого впливу ЦД та ішемії-реперфузії у КЛЧ неокортекса, що підтверджує необхідність таких досліджень.

Мета дослідження: з'ясувати поєднаний вплив ЦД та двобічної каротидної ішемії з реперфузією різної тривалості на морфометричні параметри Vcl-2⁺ нервових і гліальних клітин кори лобової частки півкуль лабораторних щурів.

Матеріал і методи. Дослідження проведено на білих самцях щурів контрольної групи та тваринах із ЦД, який моделювали одноразовим внутрішньочеревним введенням стрептозотину (“Sigma”, Aldrich, США) двомісячним тваринам у дозі 60 мг/кг маси тіла [10]. Експериментальну групу з ЦД становили щури з рівнем глюкози в крові вище, ніж 10 ммоль/л. Тривалість діабету – 3 місяці. По досягненню 5 міс. у частини тварин контрольної групи, а також із порушенням вуглеводного обміну під калісоловим наркозом (75 мг/кг) здійснювали двобічне перетискання загальних сонних артерій упродовж 20-ти хв [11]. Одну групу тварин виводили з експерименту через 1 год, іншу – на 12-ту добу постішемічного періоду декапітацією під калісоловим наркозом 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.

Мозок вилучали на холоді, за координатами стереотаксичного атласу [12] виділяли КЛЧ півкуль головного мозку і містили у фіксатор Буена

на 24 год. Після стандартної гістологічної провідки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи завтовшки 5 мкм.

Ідентифікацію нервових та гліальних клітин, позитивних за білком Vcl-2, здійснювали імуноцитофлуоресцентним методом. Спочатку здійснювали депарафінізацію в ксилолі, потім проводили регідратацію в нисхідних концентраціях етанолу та трічі по 10 хвилин відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,4). Потім регідратовані гістологічні зрізи КЛЧ містили в інкубатор на 18 годин у вологій камері при 4 °С із первинними мишачими моноклональними антитілами до Vcl-2 щура (mouse IgG1 isotype) виробництва "Sigma Chemical" (США). Після відмивання надлишку первинних антитіл у 0,1 М фосфатному буфері зрізи містили в інкубатор на 60 хвилин при 37 °С із вторинними антитілами в розведенні 1:64. У ролі вторинних антитіл використовували козячі антитіла до повної молекули IgG миші, кон'юговані з FITC ("Sigma Chemical", США). Після інкубації зрізи промивали в 0,1 М фосфатному буфері і додавали в суміш гліцерину і фосфатного буфера в пропорції 9:1 для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Vcl-2⁺ клітини КЛЧ ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP ("Zeiss", Німеччина) за допомогою відеокамери COHU-4722 ("COHU Inc.", США). В отриманих зображеннях у комп'ютерній системі цифрового аналізу VIDAS-386 ("Kontron Elektronik", Німеччина) аналізували морфометричні параметри Vcl-2⁺ клітин, а саме: їх площу, коефіцієнти форми та елонгації.

Статистичну значимість відмінностей оцінювали за критерієм *t* Стьюдента для незалежних вибірок. Результати подано у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Результати дослідження та їх обговорення.

Встановлено, що площа Vcl-2⁺-нервових клітин у КЛЧ півкуль головного мозку не зазнала змін у жодній з експериментальних груп. Проте слід зазначити, що цей показник гліальних клітин у тварин із ЦД, за умов раннього та пізнього ішемічно-реперфузійних періодів, зменшився відповідно на 17 і 19% відносно показників у щурів із порушен-

ням вуглеводного обміну (таблиця). Після 20-хвилинної каротидної ішемії з одногодинною реперфузією в щурів без ЦД коефіцієнти форми та елонгації Vcl-2⁺-нейро- і гліоцитів КЛЧ залишалися незмінними, а на 12-ту добу спостереження ці параметри гліоцитів достовірно зменшилися відповідно на 4% і 7% щодо контролю. У щурів із тримісячним ЦД виявлено зменшення коефіцієнтів форми та елонгації Vcl-2⁺-нейроцитів відповідно на 14 і 11% відносно показника тварин контрольної групи; дані параметри гліоцитів у щурів цієї експериментальної групи змін не зазнали. У ранньому терміні ішемічно-реперфузійного пошкодження КЛЧ півкуль головного мозку тварин із діабетом мало місце достовірне підвищення коефіцієнтів форми та елонгації Vcl-2⁺-нейронів відповідно на 10 і 7% та зменшення цих параметрів Vcl-2⁺-гліоцитів відповідно на 4 і 9% відносно показників у щурів із ЦД. На 12-ту добу постішемічного періоду у тварин із ЦД спостерігалось підвищення коефіцієнта елонгації Vcl-2⁺-нервових клітин на 7% і зниження коефіцієнтів форми та елонгації Vcl-2⁺-гліальних клітин відповідно на 5 та 10% стосовно даних показників у щурів із ЦД без ішемії.

Висновки. 1. У тварин без порушення вуглеводного обміну двобічна каротидна ішемія-реперфузія порушує морфометричні параметри Vcl-2⁺-гліоцитів кори лобової частки півкуль головного мозку на 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду. 2. У щурів із тримісячним цукровим діабетом зазнають змін морфометричні параметри Vcl-2⁺-нейроцитів. 3. Тримісячний стрептозоточиніндукований діабет модифікує реакцію морфометричних параметрів Vcl-2⁺-нейроцитів кори лобової частки в ранньому терміні спостереження за рахунок змін коефіцієнтів форми та елонгації, у пізньому – за рахунок останнього; реакція гліоцитів модифікована в ранньому терміні за рахунок площі клітин, їх коефіцієнтів форми та елонгації, у пізньому – за рахунок площі.

Перспективи подальших досліджень. Планується вивчення динаміки вмісту білка Vcl-2 у нейро- та гліоцитах КЛЧ тварин зазначених експериментальних груп.

Список використаної літератури

1. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants / G. Danaei, M. Finucane, Y. Lu [et al.] // *Lancet*. – 2011. – Vol. 378, № 9785. – P. 31-40.
2. Острые нарушения мозкового кровообращения и сахарный диабет 2 типа / М.М. Танашиян, К.В. Антонова, О.В. Лагода [и др.] // *Анналы клин. и эксперимент. невролог.* – 2014. – Т. 8, № 3. – С. 4-8.
3. Li P.A. Mechanisms of hyperglycemia-enhanced ischemic brain damage / P.A Li, Q. He // *Transl. Med. Res.* – 2013. – Vol. 3. – P. 1-11.
4. Роль гена раннего реагирования C-FOS в норме и в нейродеструктивной токсической патологии. Возможности фармакокоррекции нейропептидными лекарственными средствами / И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий, С.В. Павлов [и др.] // *Современные проблемы токсикологии.* – 2008. – № 1. – С. 17-27.
5. Hughes P. Role of Bim and other Bcl-2 family members in autoimmune and

degenerative diseases / P. Hughes, P. Bouillet, A. Strasser // *Curr. Dir. Autoimmun.* – 2006. – Vol. 9. – P. 74-94. 6. Sofroniew M.V. Astrocytes: biology and pathology / M.V. Sofroniew, H.V. Vinters // *Acta Neuropathol.* – 2010. – Vol. 119. – P. 7-35. 7. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia / L. Li, A. Lundkvist, D. Andersson [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2008. – Vol. 28. – P. 468-481. 8. Ткачук С.С. Експресія білків Hif-1 α , p53 та Bcl-2 в головному мозку за умов двобічної каротидної ішемії-реперфузії на тлі цукрового діабету в самців-щурів / С.С. Ткачук, О.М. Леньков // *Клін. та експеримент. патолог.* – 2010. – Т. IX, № 2(32). – С. 111-113. 9. Кметь Т.І. Модифікуючий вплив цукрового діабету на чутливість клітин лобової частки кори великих півкуль головного мозку щурів-самців до ішемічно-реперфузійного пошкодження / Т.І. Кметь // *Клін. анатом. та оперативн. хірург.* – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 65-70. 10. 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. 11. Скибо Г.Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г.Г. Скибо // *Патолог.* – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 22-30. 12. 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.

ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ BCL-2⁺ НЕРВНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОРЫ ЛОБНОЙ ДОЛИ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА САМЦОВ-КРЫС ПРИ ОСЛОЖНЕНИИ СТРЕПТОЗОТОЦИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА ДВУСТОРОННЕЙ КАРОТИДНОЙ ИШЕМИЕЙ-РЕПЕРФУЗИЕЙ

Резюме. Исследовано влияние ишемии-реперфузии головного мозга на морфометрические параметры Bcl-2⁺ нервных и глиальных клеток коры лобной доли полушарий крыс с сахарным диабетом. Установлено, что у животных без нарушения углеводного обмена двусторонняя каротидная ишемия-реперфузия нарушает морфометрические параметры Bcl-2⁺-глиоцитов коры лобной доли полушарий головного мозга на 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода. У крыс с трехмесячным сахарным диабетом изменениям подлежат морфометрические параметры Bcl-2⁺-нейроциты. Трехмесячный стрептозотацин-индуцированный диабет модифицирует реакцию морфометрических параметров Bcl-2⁺-нейроцитов коры лобной доли после 20-минутной ишемии с односторонней реперфузией за счет изменений коэффициентов формы и элонгации, на 12-е сутки – за счет последнего; реакция глиоцитов модифицирована в раннем сроке за счет площади клеток, их коэффициентов формы и элонгации, в позднем – за счет площади.

Ключевые слова: сахарный диабет, каротидная ишемия-реперфузия, Bcl-2⁺-нейроциты и глиоциты.

CHANGES OF BCL-2⁺MORPHOMETRIC PARAMETERS OF NERVE AND GLIAL CELLS OF THE FRONTAL CEREBRAL LOBE CORTEX IN MALE RATS IN CASE OF STREPTOZOTOCIN DIABETES MELLITUS COMPLICATED BY BILATERAL CAROTID ISCHEMIA-REPERFUSION

Abstract. The influence of ischemia-reperfusion of the brain up on Bcl-2⁺ morphometric parameters of the nerve and glial cells of the frontal cerebral lobe cortex of rats with diabetes mellitus has been studied. Bilateral carotid ischemia-reperfusion in animals with out disorders of carbohydrate metabolism has been found to disturb Bcl-2⁺ morphometric parameters of glial cells of the frontal cerebral lobe cortex on the 12th day of ischemic-reperfusion period. In rats with three-month diabetes mellitus morphometric parameters of Bcl-2⁺-nerve cells undergo changes. Three-month streptozotocin-induced diabetes modifies the reaction of morphometric parameters of Bcl-2⁺-nerve cells of the frontal lobe cortex in the early term of observation at the expense of changes of the coefficients of their shape and elongation, in the late one – at the expense of the latter; glial cells reaction is modified in the early term at the expense of cellular area, their coefficients of their shape and elongation, in the late one – at the expense of the area.

Key words: diabetes mellitus, carotid ischemia-reperfusion, Bcl-2⁺-nerve and glial cells.

State Higher Educational Establishment in Ukraine
“Bukovinian State Medical University” (Chernivtsi)

Надійшла 06.06.2016 р.
Рецензент – проф. Пашковська Н.В. (Чернівці)