

Т. І. Кметь

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

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОМЕТРИЧНОЇ РЕАКЦІЇ VCL-2+ КЛІТИН КОРИ СКРОНЕВОЇ ЧАСТКИ ПІВКУЛЬ У РАНЬОМУ ТА ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДАХ ІШЕМІЧНО-РЕПЕРFUЗІЙНОГО ПОШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

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

Резюме. Вивчено особливості впливу каротидної ішемії з реперфузією різної тривалості на динаміку реакції морфометричних параметрів Vcl-2+-нервових та гліальних клітин кори скроневої частки головного мозку в щурів з експериментальним цукровим діабетом. Показано, що у щурів-самців без порушення вуглеводного обміну короткотривала двобічна каротидна ішемія з одногодинною реперфузією модифікує площу, еквівалентний діаметр та коефіцієнт форми Vcl-2+-нейроцитів кори скроневої частки головного мозку. На 12-ту добу ішемії-реперфузії відмічається зростання площі Vcl-2+-гліальних клітин і коефіцієнта форми Vcl-2+-нервових клітин. У тварин із цукровим діабетом спостерігається зростання площі та коефіцієнта елонгації Vcl-2+-імунореактивного матеріалу гліоцитів скроневої частки неокортексу і зниження коефіцієнту форми Vcl-2+-нейронів. Доведено, що тримісячний стрептозотоцин-індукований діабет модифікує реакцію морфометричних параметрів Vcl-2+-нейроцитів кори скроневої частки в ранньому терміні спостереження за рахунок зміни еквівалентного діаметру, у пізньому - за рахунок коефіцієнтів форми та елонгації; реакція гліоцитів модифікована в обох періодах ішемії-реперфузії за рахунок останніх.

Вступ

Одним з найбільш розповсюджених патологічних станів у світі визнано цукровий діабет (ЦД). Так, за оцінками ВООЗ на дану патологію хворіють близько 347 мільйонів людей. Захворюваність цією недугою щорічно на планеті зростає на 5-7 %, а кожні 12-15 років - подвоюється [6].

ЦД являє собою одну з найбільш значимих соціальних проблем, у зв'язку з високою смертністю і ранньою інвалідизацією, внаслідок ускладнень з боку серцево-судинної, центральної та інших систем. Найбільш частим є ураження судин головного мозку, що призводить до виникнення синдрому цереброваскулярної недостатності [3].

Відомо, що апоптоз нейронів та глії являється повільним процесом і триває до появи морфологічних ознак. З одної сторони це вказує на присутність певного проміжку часу після ішемії, коли відсутні морфологічні ознаки, однак присутні риси порушення морфофункціональних і морфометричних характеристик нервових та гліальних клітин. Даний інтервал часу є ключовим моментом для фармакологічного захисту цих клітин, який міг би перервати каскад процесів ушкодження нейро-

цитів, гліоцитів та забезпечити їх повернення до оптимального функціонального стану і попередити відстрочену загибель [2]. З іншої сторони в організмі функціонують захисні механізми, які зупиняють реалізацію запрограмованої смерті клітин до яких належать регулятори апоптозу, зокрема антиапоптотичний білок Vcl-2 [7, 8].

На сьогодні дослідженні особливості морфометричних змін нервових і гліальних клітин різних відділів неокортексу, зокрема кори скроневої частки (КСЧ) великих півкуль у щурів-самців із ЦД у різні періоди ішемічно-реперфузійного ураження мозку [1]. Проте залишаються не з'ясовані особливості змін морфометричних параметрів Vcl-2+-нейро- і гліоцитів КСЧ кінцевого мозку за умов поєднання стрептозотоцин-індукованого діабету та ішемії-реперфузії в динаміці її перебігу.

Мета дослідження

Вивчити особливості впливу каротидної ішемії з реперфузією різної тривалості на морфометричні показники антиапоптотичного білка Vcl-2+ нервових і гліальних клітин кори скроневої частки кінцевого мозку в щурів з експериментальним цукровим діабетом.

Матеріал і методи

Експерименти здійснені на 66 нелінійних білих щурах-самцях. Лабораторних тварин поділено на 6 груп: контрольні; щури, яким проводили 20-хвилинну двобічну каротину ішемію з одногодинною реперфузією; тварини, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-ти хвилинної ішемії; щури з ЦД; тварини зі стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким проводили 20-ти хвилинне кліпсування загальних сонних артерій з одногодинною реперфузією; щури з гіперглікемією, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної каротидної ішемії.

Для моделювання ЦД двомісячним щурам-самцям одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотоцин ("Sigma", Aldrich, США) у дозі 60 мг/кг маси тіла [5]. В експеримент включали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Тривалість діабету - 3 міс. По досягненні 5 міс. у частини тварин контрольної групи, а також із ЦД під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг) здійснювали двобічне перетискання загальних сонних артерій упродовж 20-ти хв [4]. Одну групу тварин виводили з експерименту через 1 год., іншу - на 12-ту добу постішемичного періоду декапітацією під каліпсоловим наркозом.

Утримання і маніпуляції над тваринами проводилися з дотриманням норм національного та міжнародного законодавства згідно із положеннями "Загальні етичні принципи проведення експериментів над тваринами" (Київ, 2001).

Оперативно на холоді виймали мозок і за координатами стереотаксичного атласу [9] виділяли скроневу частку півкуль головного мозку та поміщали у фіксатор Буена на 24 год. Після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм.

Ідентифікацію нейронів та гліоцитів, позитивних за білком Vcl-2, здійснювали імуноцитофлуоресцентним методом. Спочатку здійснювали депарафінізацію в ксилолі, потім проводили регідратацію в нисхідних концентраціях етанолу та тричі по 10 хвилин відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН =7,4). Потім регідратовані гістологічні зрізи КСЧ поміщали в інкубатор на 18 годин у вологій камері при 4 оС з первинними мишачими моноклональними антитілами до Vcl-2 щура (mouse IgG1 isotype) виробництва "Sigma Chemical" (США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи поміщали в інкубатор на 60 хвилин при 37°С з вторинними антитілами в розведенні 1:64. В якості 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 поміщали в суміш гліцерину і фосфатного буфера в пропорції 9:1 для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Vcl-2+ клітини КСЧ 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, еквівалентний діаметр, коефіцієнти форми та елонгації.

Цифрові результати досліджень опрацьовані в прикладних програмах "Statistica 6.0" та "SPSS 13" із використанням критерію t Стьюдента для незалежних вибірок.

Обговорення результатів дослідження

За даними лабораторного дослідження встановлено (табл.), що каротидна ішемія з одногодинною реперфузією в щурів без ЦД спричинила зниження площі, еквівалентного діаметру та коефіцієнту форми Vcl-2+ нервових клітин скроневого відділу неокортексу відповідно на 22, 10 і 3 % стосовно контролю. Слід відмітити, що усі морфометричні параметри антиапоптичного білка Vcl-2+ гліоцитів у тварин цієї експериментальної групи змін не зазнали.

Проте на 12-ту добу спостереження зміни досліджуваних показників КСЧ півкуль кінцевого мозку були наступними: коефіцієнт форми Vcl-2+ нейронів збільшився на 5 % стосовно раннього терміну ішемії-реперфузії, а площа Vcl-2+ глії зросла на 13 % щодо контролю. Характерно, що вірогідних змін зі сторони еквівалентного діаметру та коефіцієнту елонгації Vcl-2+ імунореактивного матеріалу обох класів клітин не зафіксовано.

Подальші проведені дослідження показали, що моделювання стрептозотоцин-індукованого діабету супроводжувалося зростанням площі та коефіцієнта елонгації Vcl-2+ гліоцитів скроневої частки нової кори, відповідно на 9 і 7 % та зниження коефіцієнту форми Vcl-2+ нейронів на 3 % по відношенню до контрольної групи тварин.

Після 20-хвилинної каротидної ішемії з одногодинною реперфузією у щурів-самців із гіперглікемією мало місце достовірне зменшення коефіцієнтів форми та елонгації Vcl-2+ гліальних клітин відповідно на 6 і 11 % стосовно параметра у групі спостереження із порушенням вулководного обміну й на 4 та 6 % відносно показників за такого втручання в тварин без цукрового діабету.

Таблиця

Морфометричні параметри Vcl-2+-клітин кори скроневої частки великих півкуль щурів зі стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m); (n=11)

Група спостереження	Площа, мкм ²	Еквівалентний діаметр, мкм	Коефіцієнт форми	Коефіцієнт елонгації
Нервові клітини				
Контроль	68,21±5,61	8,596±0,272	0,809±0,011	0,703±0,029
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	52,54±4,53*	7,772±0,189*	0,784±0,007*	0,676±0,017
Ішемія-реперфузія (12 діб)	58,62±5,98	8,046±0,584	0,824±0,015 [^]	0,714±0,013
Діабет	59,12±5,85	8,292±0,381	0,782±0,009*	0,672±0,024
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	61,92±3,89	8,430±0,241**	0,777±0,011	0,672±0,015
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	54,65±3,70	7,990±0,234	0,785±0,012 ^{&}	0,669±0,017 ^{&}
Гліальні клітини				
Контроль	9,26±0,23	3,308±0,230	0,866±0,017	0,676±0,015
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	10,21±0,56	3,475±0,103	0,852±0,010	0,683±0,014
Ішемія-реперфузія (12 діб)	10,46±0,49*	3,517±0,184	0,833±0,019	0,652±0,024
Діабет	10,06±0,32*	3,451±0,154	0,879±0,015	0,721±0,011*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	9,66±0,45	3,389±0,084	0,823±0,010 ^{#, **}	0,640±0,014 ^{#, **}
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	9,81±0,52	3,409±0,096	0,835±0,011 [#]	0,652±0,015 [#]

Примітка: вірогідність різниці порівняно з: * - контролем; [^] - ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у контрольних тварин; # - діабетом; ** - ішемією-реперфузією (20 хв/1 год) у контрольних щурів та тварин із діабетом; [&] - ішемією-реперфузією (20 хв/12 діб) у контрольних щурів та тварин із діабетом

Крім того, в цей період спостереження виявлено вірогідне збільшення еквівалентного діаметру Vcl-2+-нервових клітин на 8 % стосовно групи лабораторних щурів із 20-ти хвилинною ішемією/одноденною реперфузією без діабету. Решта показників морфометричного стану Vcl-2+ нервових та гліальних клітин КСЧ півкуль головного мозку залишалися без змін.

Реакція антиапоптичного потенціалу гліоцитів скроневої частки нової кори зберігалася до 12-ї доби спостереження (у цей період стосовно ЦД без порушення мозкового кровообігу зниження коефіцієнтів форми та елонгації Vcl-2+-глії складало відповідно 5 та 10 %.

Крім того, в умовах довготривалого ішемічно-реперфузійного ураження головного мозку у тварин із діабетом зафіксовано зниження вище вказаних параметрів Vcl-2+- імунореактивного матеріалу нервових клітин КСЧ півкуль кінцевого мозку, відповідно на 5 та 6 % - відносно показників у щурів-самців із пізнім порушенням церебрального кровообігу без гіперглікемії. Варто відмітити, що еквівалентний діаметр Vcl-2+- гліальних клітин скроневої частки неокортексу не зазнав змін у

жодній з експериментальних груп.

Висновки

1. У щурів-самців без порушення вуглеводного обміну короткотривала двобічна каротидна ішемія з одноденною реперфузією модифікує площу, еквівалентний діаметр та коефіцієнт форми Vcl-2+-нейроцитів кори скроневої частки головного мозку. На 12-ту добу ішемії-реперфузії відмічається зростання площі Vcl-2+-гліальних клітин і коефіцієнта форми Vcl-2+-нервових клітин.

2. У тварин із цукровим діабетом спостерігається зростання площі та коефіцієнта елонгації Vcl-2+-імунореактивного матеріалу гліоцитів скроневої частки неокортексу і зниження коефіцієнту форми Vcl-2+-нейронів.

3. Тримісячний стрептозотоцин-індукований діабет модифікує реакцію морфометричних параметрів Vcl-2+-нейроцитів кори скроневої частки в ранньому терміні спостереження за рахунок зміни еквівалентного діаметру, у пізньому - за рахунок коефіцієнтів форми та елонгації; реакція гліоцитів модифікована в обох періодах ішемії-реперфузії за

рахунок останніх.

Перспективи подальших досліджень

Оцінка результатів даного дослідження свідчить про доцільність пошуку різних маркерів чутливості, що реагують на ішемічно-реперфузійне ураження головного мозку у поєднанні з системними змінами метаболізму.

Література. 1. Бойчук Т. М. Динаміка змін щільності розташування та морфометричних параметрів клітин кори скроневої частки півкуль головного мозку при каротидній ішемії-реперфузії в шурів з експериментальним цукровим діабетом / Т. М. Бойчук, Т. І. Кметь // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2014. - Т.18, №2. - С. 421 - 425. 2. Жилуок В. І. Характеристика морфологічних змін нервових та ендотеліальних клітин СА1 зони гіпокампу у шурів з алоксан-індукованою гіперглікемією за умов застоювання ноотропних засобів // В. І. Жилуок, В. І. Мамчур // Морфологія. - 2012. - Т. 6, №1. - С. 31 - 36. 3. Мищенко Т. С. Сахарный диабет и хронические нарушения мозгового кровообращения / Т. С. Мищенко, Т. Г. Перцева // Международный неврологический журнал. - 2009. - №3. - С. 57 - 66. 4. 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. 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. Danaei G. 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. 7. Hughes P., Bouillet P., Strasser A. Role of Bim and other Bcl-2 family members in autoimmune and degenerative diseases // Curr. Dir. Autoimmun. - 2006. - V. 9. - P. 74 - 94. 8. Kari V. BCL2 - Down-regulates DNA / V. Kari // J. Biol. Chem. - 2011. - Vol. 287. - P. 35342 - 35348. 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.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ BCL-2+ КЛЕТОК КОРЫ ВИСОЧНОЙ ДОЛИ ПОЛУШАРИЙ В РАННЕМ И ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С ДИАБЕТОМ

Т. И. Кметь

Резюме. Изучены особенности влияния каротидной ишемии с реперфузией различной продолжительности на динамику реакции морфометрических параметров Bcl-2+ нервных и глиальных клеток коры височной доли головного мозга у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Показано, что у крыс-самцов без нарушения углеводного обмена кратковременная двухсторонняя каротидная ишемия

с одночасовой реперфузией модифицирует площадь, эквивалентный диаметр и коэффициент формы Bcl-2+ -нейроцитов коры височной доли головного мозга. На 12-е сутки ишемии-реперфузии отмечается рост площади Bcl-2+ -глиальных клеток и коэффициента формы Bcl-2+ нервных клеток. У животных с сахарным диабетом наблюдается рост площади и коэффициента элонгации Bcl-2+ -иммуно-реактивного материала глиоцитов височной доли неокортекса и снижение коэффициента формы Bcl-2+ -нейронов. Доказано, что трехмесячный стрептозотоцин-индуцированный диабет модифицирует реакцию морфометрических параметров Bcl-2+ -нейроцитов коры височной доли в раннем сроке наблюдения за счет изменения эквивалентного диаметра, в позднем - за счет коэффициентов формы и элонгации; реакция глиоцитов модифицирована в обеих периодах ишемии-реперфузии за счет последних.

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

MORPHOMETRIC REACTION PECULIARITIES OF BCL-2+ CELLS OF THE TEMPORAL CEREBRAL LOBE IN THE EARLY AND REMOTE PERIODS OF ISCHEMIC-REPERFUSION INJURY OF THE BRAIN IN RATS WITH DIABETES MELLITUS

T. I. Kmet

Abstract. Peculiarities of the influence of carotid ischemia with various duration of reperfusion on the dynamics of morphometric parameter reaction of Bcl-2+ -nerve and glial cells of the temporal cerebral cortex in the brain of rats with experimental diabetes mellitus have been studied. A short-term bilateral carotid ischemia with one-hour reperfusion in male rats with out disorders of carbohydrate metabolism has been found to modify the square, equivalent diameter and shape coefficient of Bcl-2+ -nerve cells in the temporal lobe of the brain. On the 12th day of ischemia-reperfusion the square of Bcl-2+ -glial cells and shape coefficient of Bcl-2+ -nerve cells increase. In animals with diabetes mellitus the square and elongation coefficient of Bcl-2+ -immunoreactive glial material in the temporal cerebral cortex increase and the shape coefficient of Bcl-2+ -nerve cells decrease. Three-month streptozotocin-induced diabetes has been proved to modify morphometric parameter reaction of Bcl-2+ -nerve cells of the temporal cortex in the early term of the study at the expense of changes of the equivalent diameter, and in the late term - at the expense of the coefficients of shape and elongation; reaction of glial cells is modified in both periods of ischemia-reperfusion at the expense of the latter ones.

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

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Clin. and experim. pathol. - 2016. - Vol.15, №3 (57). - P.55-58.

Надійшла до редакції 1.09.2016

Рецензент – проф. С.С.Ткачук

© Т.І. Кметь, 2016