

О.В. Ткачук

Вплив ішемії-реперфузії головного мозку на проліферативну активність тимоцитів у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Ключові слова: цукровий діабет, каротидна ішемія, PCNA, тимоцити.

У контрольних щурів каротидна ішемія посилює проліферативну активність усіх досліджених класів PCNA⁺ лімфоцитів кіркової та мозкової зон тимуса. У тварин з цукровим діабетом за такого втручання сумарний аналіз змін експресії PCNA в тимоцитах і щільності розташування PCNA⁺ тимоцитів свідчить про пригнічення проліферації найбільш зрілих функціонально активних класів клітин.

Влияние ишемии-реперфузии головного мозга на пролиферативную активность тимоцитов крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом

О.В. Ткачук

У контрольных крыс каротидная ишемия усиливает пролиферативную активность всех исследованных классов PCNA⁺ лимфоцитов корковой и мозговой зон тимуса. У крыс с сахарным диабетом после данного вмешательства суммарный анализ изменения экспрессии PCNA в тимоцитах и плотности расположения разных классов PCNA⁺ тимоцитов свидетельствует об угнетении пролиферации наиболее зрелых функционально активных клеток.

Ключевые слова: сахарный диабет, каротидная ишемия, PCNA, тимоциты.**Патология.** – 2011. – Т.8, №2. – С. 26–29

Effect of ischemia-reperfusion of the brain on the proliferative activity of thymocytes of rats with streptozotocin-induced diabetes

О.В. Ткачук

In control rats carotid ischemia enhances the proliferative activity of all examined classes of PCNA⁺ lymphocytes of medullary and cortical zones of the thymus. In animals with diabetes the overall analysis of the changes in PCNA expression in thymocytes and the density of different classes of PCNA⁺ thymocytes after this intervention indicates the inhibition of proliferation of the most mature functionally active cells.

Key words: diabetes, ischemia-reperfusion of the brain, PCNA, thymocytes.**Pathologia.** 2011; 8(2): 26–29

Ішемічно-реперфузійні пошкодження головного мозку супроводжуються деструктивними змінами нервової тканини та порушеннями проникності гематоенцефалічного бар'єру, що призводить до ініціації автоімунних процесів [1,2]. Найнебезпечнішими є повторні ішемічні епізоди, що спричинюють хронічну активацію глії, астроцитів і запалення з подальшою активацією автоімунних механізмів [3,4]. У хворих на цукровий діабет (ЦД) повторна неповна глобальна ішемія головного мозку є складовою гіпо-, гіперглікемічних та кетоацидотичних ком [5–7]. Оскільки в патогенезі ЦД 1 типу автоімунним процесам також належить одна з ключових ролей [8,9], автоімунна агресія, що виникає за умов ішемії-реперфузії головного мозку, поглиблює імунну дизрегуляцію, спричинену основним захворюванням.

Імунний гомеостаз значною мірою залежить від співвідношення процесів проліферації та апоптозу тимоцитів. Порушення проліферативної активності клітин лімфоїдної популяції тимуса за умов цукрового діабету підтвержені експериментально [8], однак подібні дослідження при ускладненні ЦД ішемічно-реперфузійним ушкодженням мозку в спеціальній літературі відсутні.

Мета роботи

Вивчити вплив ішемії-реперфузії головного мозку

на експресію PCNA в тимоцитах і структуру PCNA⁺ клітин лімфоїдної популяції тимуса у контрольних щурів і тварин з ЦД.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено на шестимісячних білих нелінійних щурах контрольної групи та тваринах того ж віку з чотиримісячним ЦД, який відтворювали однократним внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (Sigma, США, 60 мг/кг маси) дво-місячним щурам [9]. У дослід брали щурів з рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Неповну глобальну ішемію мозку моделювали 20-хвилинним кліпсуванням сонних артерій [10], після чого кровотік по цих судинах відновлювали. На 12 добу після ішемії-реперфузії мозку тварин виводили з експерименту декапітацією під каліпсоловим наркозом. Тимус 18 год фіксували в розчині Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін, готували серійні зрізи товщиною 5 мкм. Для вивчення проліферативної активності тимоцитів проводили імуноцитофлуоресцентне визначення ядерного антигену клітинної проліферації PCNA – кофактора ДНК-полімерази-дельта, необхідного для реплікації ДНК в S-фазі [11], що є одним із показників мітотичної активності клітини [12]. Зрізи тимуса депарафінували в ксилолі, регідрували у висхідних концентраціях етанолу, трічі по 10 хв відмивали

в 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,4), після чого 18 год їх інкубували з первинними антитілами – мишачими IgG2a до PCNA щура (Sigma Chemical, США) у вологій камері за T=4°C. Надлишок первинних антитіл відмивали в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хв (T=37°C) зі вторинними антитілами (антитіла кроля до повної молекули IgG миші, кон'юговані з FITC (Sigma Chemical, США) у розведенні 1:64. Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером, заключали в суміш гліцерину й фосфатного буфера (9:1) для люмінесцентної мікроскопії. Визначення PCNA проводили у випадково відібраних зрізах залози.

Для опрацювання зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [8].

Статистичну значущість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних вибірок. Дані представлено у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження наведено в табл. 1, 2. У контрольних щурів ішемія-реперфузія головного мозку посилила експресію PCNA у великих, середніх і малих тимоцитах кіркової зони, про що свідчить зростання як сумарного вмісту даного фактора, так і його концентрації. Це можна розцінити як посилення мітотичних

процесів у даних клітинах тимуса, що підтверджується і зростанням в залозі тварин даної експериментальної групи сумарної щільності розташування PCNA⁺ тимоцитів, що відбулося, переважно, за рахунок середніх лімфоцитів (табл. 2).

Чотиримісячний ЦД, судячи зі зростання експресії PCNA, посилив проліферативні процеси в лімфобластах, великих і середніх тимоцитах кіркової зони. Однак у малих тимоцитах, найбільш зрілих і функціонально активних, концентрація PCNA знизилась. Аналіз щільності різних класів тимоцитів свідчить, що у тварин даної серії ситуація не настільки однозначна, як після ішемії-реперфузії головного мозку. Незважаючи на те, що сумарна щільність PCNA⁺ тимоцитів у щурів з ЦД зросла, щільність PCNA⁺ лімфобластів, великих і середніх тимоцитів достовірно знизилась. Зростання сумарної кількості відбулося за рахунок малих тимоцитів, однак, якщо брати до уваги, що експресія PCNA у клітинах цього класу знизилась, у цілому активність проліферативних процесів також зменшується. Зростання сумарної щільності PCNA⁺ тимоцитів можна розглядати як компенсаторну реакцію залози на пригнічення мітотичних процесів.

У тварин з ЦД характер експресії PCNA у відповідь на ішемію-реперфузію головного мозку відрізнявся від такої в контрольних тварин. За умов поєднаної патології в

Таблиця 1

Вміст PCNA у клітинах лімфоїдної популяції тимуса щурів з цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m)

Група спостереження	Сумарний вміст PCNA		Вміст PCNA на 1 мкм ²	
	Кіркова зона	Мозкова зона	Кіркова зона	Мозкова зона
Лімфобласти				
Контроль	2,625±0,027	2,599±0,043	0,606±0,022	0,613±0,019
Ішемія-реперфузія	2,686±0,022	2,707±0,018*	0,679±0,012*	0,690±0,013*
Діабет	2,907±0,061*	2,731±0,028*	0,847±0,057*	0,707±0,028*
Діабет та ішемія-реперфузія	2,679±0,016^	2,614±0,029^	0,652±0,011^	0,623±0,027^
Великі лімфоцити				
Контроль	2,362±0,009	2,412±0,014	0,572±0,008	0,610±0,011
Ішемія-реперфузія	2,423±0,010*	2,470±0,009*	0,633±0,008*	0,679±0,008*
Діабет	2,465±0,028*	2,532±0,025*	0,679±0,026*	0,734±0,024*
Діабет та ішемія-реперфузія	2,410±0,008^	2,436±0,013^	0,616±0,007^	0,646±0,012^
Середні лімфоцити				
Контроль	2,034±0,004	2,039±0,007	0,566±0,002	0,575±0,004
Ішемія-реперфузія	2,069±0,004*	2,138±0,004*	0,611±0,003*	0,652±0,003*
Діабет	2,047±0,007	2,124±0,010*	0,597±0,004*	0,651±0,007*
Діабет та ішемія-реперфузія	2,057±0,004	2,089±0,007^	0,586±0,002	0,586±0,002^
Малі лімфоцити				
Контроль	1,457±0,004	1,452±0,007	0,544±0,002	0,536±0,002
Ішемія-реперфузія	1,496±0,004*	1,528±0,005*	0,580±0,002*	0,619±0,002*
Діабет	1,455±0,004	1,466±0,007	0,532±0,001*	0,570±0,002*
Діабет та ішемія-реперфузія	1,477±0,005^	1,463±0,009	0,531±0,001	0,536±0,003^

Примітки: * – вірогідність змін щодо показників у контрольних тварин; ^ – у тварин з цукровим діабетом.

Щільність PCNA⁺ клітин у загруднинній залозі щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m)

Група спостереження	Сумарна щільність PCNA ⁺ клітин	PCNA ⁺ – лімфобласти	PCNA ⁺ – великі лімфоцити	PCNA ⁺ – середні лімфоцити	PCNA ⁺ – малі лімфоцити
Кіркова зона					
Контроль	1078±19	$\frac{9,56 \pm 1,56}{1,41 \pm 0,27}$	$\frac{27,30 \pm 1,73}{3,60 \pm 0,40}$	$\frac{226,5 \pm 9,6}{23,41 \pm 1,10}$	$\frac{812,5 \pm 23,5}{71,40 \pm 1,31}$
Ішемія-реперфузія	1167±15*	$\frac{11,1 \pm 1,33}{1,00 \pm 0,12}$	$\frac{32,1 \pm 2,05}{2,98 \pm 0,23}$	$\frac{278 \pm 7,50^*}{23,8 \pm 0,61}$	$\frac{842 \pm 14,0}{71,88 \pm 0,67}$
Діабет	1150±18*	$\frac{3,16 \pm 0,54^*}{0,64 \pm 0,21^*}$	$\frac{13,20 \pm 1,87^*}{1,50 \pm 0,24^*}$	$\frac{161,8 \pm 6,49^*}{15,40 \pm 0,69^*}$	$\frac{996,0 \pm 20,3^*}{82,0 \pm 0,80^*}$
Діабет та ішемія-реперфузія	1079±13 [^]	$\frac{12,70 \pm 1,73^{\wedge}}{1,28 \pm 0,18^{\wedge}}$	$\frac{42,48 \pm 3,10^{\wedge}}{4,07 \pm 0,31^{\wedge}}$	$\frac{326,4 \pm 8,96^{\wedge}}{30,27 \pm 0,77^{\wedge}}$	$\frac{696,1 \pm 12,8^{\wedge}}{64,29 \pm 0,82^{\wedge}}$
Медулярна зона					
Контроль	874,4±25,4	$\frac{4,48 \pm 1,61}{0,63 \pm 0,22}$	$\frac{19,93 \pm 3,24}{2,41 \pm 0,40}$	$\frac{207,8 \pm 10,4}{25,84 \pm 1,37}$	$\frac{637,2 \pm 23,4}{70,67 \pm 1,38}$
Ішемія-реперфузія	1018±16*	$\frac{18,90 \pm 1,89^*}{2,07 \pm 0,22^*}$	$\frac{44,76 \pm 2,94^*}{4,58 \pm 0,31^*}$	$\frac{338,9 \pm 8,28^*}{34,05 \pm 0,78^*}$	$\frac{609,6 \pm 14,6}{58,69 \pm 0,80^*}$
Діабет	797,0±22,4*	$\frac{12,6 \pm 2,47^*}{1,91 \pm 0,39^*}$	$\frac{28,93 \pm 3,34^*}{4,50 \pm 0,64^*}$	$\frac{191,3 \pm 9,78}{25,41 \pm 1,25}$	$\frac{563,3 \pm 24,2^*}{68,07 \pm 1,45}$
Діабет та ішемія-реперфузія	804,8±22,2	$\frac{15,36 \pm 2,66^{\wedge}}{2,61 \pm 0,56}$	$\frac{53,30 \pm 3,866}{99 \pm 0,67^{\wedge}}$	$\frac{269,4 \pm 10,4^{\wedge}}{34,16 \pm 1,12^{\wedge}}$	$\frac{462,9 \pm 18,4^{\wedge}}{55,82 \pm 1,31^{\wedge}}$

Примітки: у чисельнику – щільність PCNA⁺ клітин на 1 мм² загруднинної залози; у знаменнику – відсоткова частка окремих класів PCNA⁺ клітин; * – вірогідність змін щодо показників у контрольних тварин; [^] – у тварин з цукровим діабетом.

лімфобластах і великих тимоцитах знизився як сумарний вміст, так і концентрація PCNA, у малих – концентрація даного чинника, а в середніх – достовірних змін не відзначено, що в цілому засвідчує суттєве пригнічення проліферативних процесів. Зіставлення зазначених даних зі змінами щільності PCNA⁺ тимоцитів демонструє неоднозначність змін у різних субпопуляціях. Сумарна щільність PCNA⁺ тимоцитів у тварин даної експериментальної групи знижується, як і щільність малих тимоцитів. Однак щільність PCNA⁺ лімфобластів, великих і середніх тимоцитів достовірно зростає. Можна думати, що пригнічення експресії PCNA у всіх класах тимоцитів компенсується зростанням їх кількості, однак на етапі досягнення зрілості кількість проліферуючих малих лімфоцитів різко зменшується.

У мозковій зоні тимуса контрольних тварин після ішемії-реперфузії головного мозку в усіх класах тимоцитів сумарний вміст і концентрація PCNA зросли, що узгоджується зі зростанням як сумарної щільності PCNA⁺ тимоцитів, так і всіх класів клітин, за винятком малих, і свідчить про посилення їх проліферативної активності. Практично такі ж зміни вмісту PCNA виявлено в даній зоні щурів з ЦД. Аналіз структури класів тимоцитів у тварин цієї групи показав зниження кількості малих PCNA⁺ тимоцитів при одночасному зростанні числа малих і середніх клітин, що, однак, не запобігало зниженню сумарної кількості PCNA⁺ лімфоцитів. Отже, ситуація в цій зоні залози за умов ЦД дещо протилежна тій, яка у тварин даної експериментальної групи мала місце в кірковій зоні: тут зниження загальної кількості проліферуючих тимоцитів дещо нівелюється посиленням експресії PCNA в усіх класах клітин.

Ішемія-реперфузія мозку на тлі ЦД сумарну кількість PCNA⁺ тимоцитів не змінює, однак вона суттєво знижує кількість малих PCNA⁺ тимоцитів. Хоча при цьому зростає кількість усіх інших PCNA⁺ класів клітин, проте експресія PCNA в усіх класах тимоцитів знижується. Отже, сумарна оцінка даних при поєднанні ЦД та ішемії-реперфузії мозку дозволяє говорити про зниження проліферативної активності тимоцитів, особливо зрілих, функціонально активних.

Висновки

1. У контрольних щурів ішемія-реперфузія головного мозку посилює проліферативну активність усіх досліджених класів тимоцитів кіркової та мозкової зон залози.

2. Ішемія-реперфузія головного мозку у тварин з цукровим діабетом пригнічує експресію PCNA в усіх класах клітин лімфоїдної популяції мозкової зони тиму-са та в лімфобластах і великих лімфоцитах – кіркової, що на фоні зниження сумарної кількості клітин у кірковій зоні та малих тимоцитів у кірковій і мозковій свідчить про пригнічення проліферації найбільш зрілих функціонально активних класів клітин.

Література

1. Сковрцова В.И. Ишемический инсульт / В.И. Сковрцова, М.А. Евзельман. – Орел, 2006. – 404 с.
2. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: Activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures / G.A. Rosenberg, L.A. Cunningham, E.Y. Estrada, M. Grossetete et al. // Elsev. Netherlands. – 2001. – №1–2. – P. 104–112.
3. Прогностическое значение маркеров воспаления и аутоантител к нейроспецифическим антигенам у больных с острым ишемическим инсультом / Н.Ю. Рулева, П.Р. Камчатнов, Т.К. Люкова // Нервные клетки и их иммунные

- функции // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т. 5, №1. – С. 211.
4. *Вастьянов Р.С.* Нейротропные эффекты цитокинов и факторов роста / Р.С. Вастьянов, А.А. Олейник // Успехи физиол. наук. – 2007. – Т. 38, №1. – С. 39–54.
 5. *Glymour M.M.* Can Self-Reported Strokes Be Used to Study Stroke Incidence and Risk Factors? / M.M. Glymour, M. Avendano // Stroke. – 2009. – Vol. 40, №3. – P. 873–879.
 6. Cerebral blood flow and cerebral edema in rats with diabetic ketoacidosis / N. Yuen, S.E. Anderson, N. Glasser [et al.] // Diabetes. – 2008. – Vol. 57, №10. – P. 2588–2594.
 7. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association / A.E. Kitabchi, G.E. Umpierrez, M.B. Murphy [et al.] // Diabetes. – 2006. – Vol. 55, №12. – P. 2739–2748.
 8. *Камышный А.М.* Поиск путей коррекции иммунных нарушений у крыс с экспериментальным сахарным диабетом с помощью введения факторов, влияющих на продукцию NO / А.М. Камышный, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов // Пробл. эндокринной патологии. – 2007. – №3. – С. 56–61.
 9. *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.
 10. Залежність ступеню пошкодження нейронів гіпокампу від тривалості ішемії мозку та постішемичного періоду / Г.Г. Скибо, Т.М. Коваленко, І.О. Осадченко // Запорозький мед. журн. – 2002. – Т. 13, №3. – С. 21–22.
 11. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair / Essers J., Theil A.F., Baldeyron C. [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2005. – Vol. 25, №21. – P. 9350–9359.
 12. *Moldovan G.L.* PCNA, the maestro of the replication fork / G.L. Moldovan, B. Pfander, S. Jentsch // Cell. – 2007. – Vol. 129, №4. – P. 665–679.

Відомості про автора:

Ткачук О.В., к. мед. н., каф. патофізіології БДМУ.

Адреса для листування:

Ткачук Олександр Володимирович. 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2, Буковинський державний медичний університет.
Тел.: (050) 675 90 88.

УДК 617.721-001.31-018

Э.Ф. Баринов, К.Э. Голубов

Динамика межтканевых отношений в радужной оболочке глаза после контузионной травмы

Донецкий национальный медицинский университет

Ключевые слова: травма глаза, радужная оболочка.

Травма глаза может индуцировать серию событий (механическое повреждение клеток, ишемия, нарушение спектра регуляторов), ведущих к нарушению межклеточных и межтканевых отношений, повреждению аккомодационного аппарата. В этом отношении уникальным объектом для анализа реактивности структур глаза является радужная оболочка, богатая сосудами, гладкими миоцитами, меланоцитами и иннервируемая альтернативными отделами нервной системы.

Цель работы: анализ морфогенеза радужной оболочки в динамике постконтузионного периода.

Работа выполнена на 20 кроликах, которым моделировали контузионную травму глаза средней тяжести. Морфологическую оценку структур проводили через 1, 3, 15 и 30 суток после травмы. Оценивали толщину радужной оболочки (РО) у корня, в промежуточной части и в области зрачкового края, удельный объем и диаметры сосудов, удельный объем клеток и межклеточного вещества. Через сутки после травмы отмечено снижение УО сосудов за счет вазоконстрикции, что сопровождалось развитием периваскулярного отека и увеличением толщины РО в промежуточной и зрачковой частях. В заднем эпителии выявлены признаки дисперсии пигмента, более выраженные в области зрачкового края. Через 3 суток на фоне спазма артериальных сосудов в области

корня радужки наблюдались признаки венозного полнокровия: увеличение диаметра и УО сосудов, увеличение толщины радужки, особенно в промежуточной зоне. Нарушение микроциркуляции сопровождалось усилением отека, более выраженного в сосудистом слое, а также в ряде случаев – в области заднего пограничного слоя, что вело к дистрофическим изменениям гладких миоцитов диллятора. В ряде случаев аналогичная реакция наблюдалась и в области зрачкового края, сопровождаясь отеком миоцитов сфинктера зрачка. Через 15 суток в радужке сохранялись признаки нарушения микроциркуляции, хотя степень отека и толщина РО снижались. В ряде случаев отмечалась диффузная инфильтрация сосудистого слоя радужки лимфоцитами и макрофагами. К 30-м суткам у большинства животных отмечено восстановление структуры радужки, сопровождавшееся реаранжировкой меланоцитов в наружном пограничном слое. При этом в области задней пограничной зоны вблизи диллятора зрачка определялась реакция фибробластов и ремоделирование матрикса.

Выводы: постконтузионное нарушение микроциркуляции, ишемия и ремоделирование матрикса РО могут объяснить нарушения аккомодации и обусловить дисфункцию гистогематических барьеров глаза.