

УДК 612.822.5:616.831-005.4]-092.9

Т.М. Бойчук,

О.М. Ніка

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

Ключові слова: ішемія-реперфузія
головного мозку, цукровий діабет,
гіпокампа, нейроцити, апоптоз.

ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ ІШЕМІЧНО-РЕПЕРФУЗІЙНОГО УШКОДЖЕННЯ КЛІТИН ГІПОКАМПА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Резюме. Досліджено ранні та відстрочені наслідки 20-хвилинної каротидної ішемії з реперфузійним періодом різної тривалості на щільність розташування нейроцитів та апоптичних клітин гіпокампа в щурів з експериментальним цукровим діабетом. Встановлено, що 20-хвилинна ішемія з односторонньою реперфузією знижує щільність розташування нейроцитів та підвищує щільність розташування апоптичних клітин у всіх досліджених полях гіпокампа, за винятком поля CA1. На 12-ту добу постішемічного періоду щільність розташування нейроцитів залишається зниженою стосовно контролю в полях CA1-CA4. Щільність апоптичних клітин у пізньому ішемічно-реперфузійному періоді залишається підвищеною в усіх полях. Чотиримісячний цукровий діабет знижує щільність розташування нейроцитів та підвищує щільність апоптичних клітин у полях CA1, CA2, CA4 і не змінює даних показників у полі CA3. У щурів із цукровим діабетом реакція на короткотривалу ішемію-реперфузію головного мозку за щільністю розташування нейроцитів та апоптичних клітин подібна до такої в контрольних тварин лише в полі CA3, а в полях CA1, CA2, CA4 - відсутня. На 12-ту добу спостереження в полях гіпокампа CA1-CA4 щільність розташування нейроцитів стосовно показників у тварин із діабетом знижується, однак щільність апоптичних клітин при цьому зростає лише в полях CA1 і CA4, що може свідчити про загибель нейроцитів в полях CA2 і CA3 шляхом некрозу.

Вступ

Вагома роль цереброваскулярної патології в структурі основних причин інвалідизації та смертності населення визначає її пріоритетне положення в експериментальних та клінічних дослідженнях сьогодення [1-3, 5, 6]. Особливої уваги потребує вивчення патогенезу тих станів, які збільшують ризик виникнення гострих порушень мозкового кровообігу внаслідок ініціації комплексу ланцюгових патофізіологічних порушень кровопостачання головного мозку з відповідними змінами його метаболізму та, в подальшому, загибеллю клітин. До таких факторів ризику виникнення інсультів, без сумніву, належить цукровий діабет (ЦД) [7-9]. Встановлено, що хворі на дану патологію значно частіше страждають на ішемічні ураження головного мозку, а перебіг останніх у них набагато тяжчий, що зумовлює високу смертність від даного ускладнення [12, 13]. Значною мірою це пояснюється адитивним ефектом спільних ланок патогенезу обох захворювань, такими, як оксидативний стрес, ендотеліальна дисфункція тощо. Разом із тим, на сьогоднішній день кількість досліджень такої поєднаної патології обмежена, що

© Т.М. Бойчук, О.М. Ніка, 2015

мотивує актуальність робіт даного спрямування.

Мета роботи

Дослідити ранні та відстрочені наслідки неповної глобальної ішемії-реперфузії головного мозку за щільністю розташування нервових клітин та клітин з ознаками апоптозу в гіпокампі в щурів із експериментальним цукровим діабетом.

Матеріал і методи

Цукровий діабет моделювали внутрішньочеревним введенням стрептозоточину (Sigma, Aldrich, США, 60 мг / кг маси) білим нелінійним самцям щурів віком два міс. [2, 3]. Через чотири міс. у частини тварин із ЦД та в шестимісячних контрольних щурів кліпсуванням обох загальних сонних артерій протягом 20 хв. моделювали двобічну каротидну ішемію-реперфузію [2]. Дослідження ранніх наслідків ішемічно-реперфузійного пошкодження гіпокампа здійснювали через одну год. від початку реперфузії, а відстрочених - на 12-ту добу після моделювання ішемії.

Оперативні втручання та евтаназію тварин здійснювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг внутрішньочеревно). На холоді швидко забирали

головний мозок і користуючись координатами стереотаксичного атласу [11] виділяли поля гіпокампа CA1, CA2, CA3 та CA4 і забрані взірці фіксували в 10 % розчині Буена впродовж 24 годин. Після стандартної гістологічної проводки їх заливали в парафінові блоки, готували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Зображення полів гіпокампа вивчали в спектрі люмінесценції на флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP (Zeiss, Німеччина) та за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4722 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Аналіз щільності розташування нейронів та апоптичних клітин здійснювали в автоматичному режимі за допомогою програми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування VIDAS-2,5 (Kontron Elektronik, Німеччина) [10]. Визначали абсолютну (кількість клітин на 1 мм² площі зрізу) та відносну (%) щільність розподілу клітин.

Експериментальні втручання здійснювали, дотримуючись 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 ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Статистичне опрацювання числових даних здійснювали в 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.

Обговорення результатів дослідження

Результати проведеного дослідження наведені в табл. 1. Вони свідчать, що у тварин без ЦД 20-хвилинна каротидна ішемія з односторонньою реперфузією призвела до достовірного зниження щільності розташування нейронів у полях CA1, CA2, CA3, CA4 на 16, 12, 14, 32 % відповідно. Отже, найсуттєвішою реакцією нервових клітин на ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку була в полі CA4, у той час як в інших досліджених полях інтенсивність її суттєво не відрізнялася.

У всіх досліджених полях гіпокампа, за винятком поля CA1, одночасно зі зниженням щільності розташування нейронів за умов каротидної ішемії-реперфузії відбулося зростання щільності апоптичних клітин (в 1,9, 2,2, 2,5 раза відповідно в полях CA2, CA3 та CA4), що можна розцінити як посилення апоптозу внаслідок активації ішемічного каскаду. Про це ж свідчить і пере-

розподіл відсоткового співвідношення нейронів та апоптичних клітин у зазначених полях, а саме - достовірно зниження частки перших на 14, 19 % і в 1,6 раза та зростання частки останніх в 1,7, 2,1 та 2,1 раза в полях CA2, CA3 та CA4 відповідно. Незрозумілим залишається відсутність змін щільності апоптичних клітин на тлі зменшення щільності нейронів у полі CA1 тварин даної експериментальної групи.

На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду щільність розташування нейронів залишалася зниженою стосовно показників у тварин контрольної групи на 14, 17, 15, 40 % у полях CA1, CA2, CA3, CA4 відповідно, однак стосовно раннього терміну спостереження зміни виявлено тільки в полі CA4, де відбулося подальше зниження даного показника на 13 %. Що стосується щільності апоптичних клітин, то в цей період вона достовірно зросла в полі CA1 в 13,1 раза стосовно контролю та в 17,6 раза - стосовно раннього терміну спостереження. У полях CA2 та CA3 даний показник залишався підвищеним стосовно контролю в 1,7 раза та 2 рази і був незмінним стосовно попереднього терміну спостереження. Своєрідною була реакція даних клітин у полі CA4 - тут щільність апоптичних клітин знизилася стосовно контролю та раннього терміну спостереження в 1,4 та 3,6 раза відповідно.

Подібного спрямування зазнали і зміни відсоткового співвідношення нейронів і апоптичних клітин: стосовно контролю в полях CA1, CA2, CA3 частка нейронів у цей період спостереження знизилася на 20, 14, 15 %, а частка апоптичних клітин зросла у 12,2, 1,7, 1,9, 1,8 раза в полях CA1, CA2, CA3, CA4. Стосовно раннього терміну спостереження частка апоптичних клітин зросла в 13,6 раза в полі CA1 та зменшилася в полі CA4 в 3,8 раза.

У полях гіпокампа щурів із ЦД виявлено достовірно зниження щільності розташування нейронів. Воно склало 23, 10, 8 % у полях CA1, CA2 і CA4 відповідно. У полях гіпокампа CA1 і CA2 тварин даної експериментальної групи стосовно показників у контролі зросла також щільність розташування апоптичних клітин у 14,3 та 1,4 раза відповідно. Знизилася частка нейронів та зросла - апоптичних клітин у полях CA1 та CA2 в 13,5 та 1,4 раза.

20-хвилинна каротидна ішемія з односторонньою реперфузією в щурів із ЦД вплинула на досліджувані показники лише в полі CA3, де відбулося зниження щільності розташування нейронів і зростання - щільності апоптичних клітин на 24 % та в 1,6 раза відповідно. Тут також відбувся відсотковий перерозподіл даних клітин за рахунок

Таблиця

Щільність різних класів клітин (на 1 мм²) у гіпокампі щурів зі стрептозоточин-індукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням

Група спостереження	Класи клітин	
	Нервові клітини	Апоптичні клітини
<i>Поле CA1</i>		
Контроль	<u>5918,6±66,8</u> 98,21±0,37	<u>111,3±23,3</u> 1,79±0,12
Ішемія-реперфузія 20 хв / 1 год	<u>5007,1±98,2*</u> 98,39±0,53	<u>83,3±27,6</u> 1,60±0,13
Ішемія-реперфузія 12 діб	<u>5080,3±126,0*</u> 78,16±1,88*^	<u>1458,85±138,23</u> 21,84±1,02*^
Діабет	<u>4550,5±149,5*</u> 75,84±2,15*	<u>1592,2±197,8*</u> 24,16±1,16*
Діабет та ішемія- реперфузія 20 хв / 1 год	<u>4188,3±201,1</u> 70,75±2,24	<u>2103,9±140,3</u> 29,25±1,13
Діабет та ішемія- реперфузія 12 діб	<u>3866,2±179,0</u> 59,84±2,33*^	<u>2574,8±164,5*</u> 40,15±1,01*^
<i>Поле CA2</i>		
Контроль	<u>4599,9±78,0</u> 84,24±0,797	<u>812,78±38,48</u> 15,75±0,417
Ішемія-реперфузія 20 хв / 1 год	<u>4034,1±143,4</u> 72,47±2,09	<u>1576,9±144,8</u> 27,52±0,532
Ішемія-реперфузія 12 діб	<u>3799,4±142,0</u> 73,06±1,65^	<u>1416,58±105,95</u> 26,94±1,08
Діабет	<u>4162,7±173,9</u> 77,68±1,25	<u>1157,89±68,25</u> 22,31±2,16*
Діабет та ішемія- реперфузія 20 хв / 1 год	<u>4117,3±160,47</u> 76,18±1,36	<u>1271,20±76,89</u> 23,81±2,24
Діабет та ішемія- реперфузія 12 діб	<u>3721,7±95,1</u> 73,52±1,49	<u>1363,5±88,1*</u> 26,48±1,01
<i>Поле CA3</i>		
Контроль	<u>3775,0±33,6</u> 85,50±0,67	<u>654,5±31,6</u> 14,50±0,36
Ішемія-реперфузія 20 хв / 1 год	<u>3236,6±63,7</u> 69,55±1,30	<u>1428,1±65,3</u> 30,45±0,33
Ішемія-реперфузія 12 діб	<u>3279,5±68,8</u> 72,75±1,47	<u>1302,7±85,8</u> 27,25±0,46
Діабет	<u>3771,8±83,7</u> 86,26±1,45	<u>624,9±70,7</u> 13,74±2,16
Діабет та ішемія- реперфузія 20 хв / 1 год	<u>2873,8±87,8</u> 74,12±2,17	<u>1012,7±87,3</u> 25,88±1,04
Діабет та ішемія- реперфузія 12 діб	<u>3433,8±64,2</u> 85,68±1,33^	<u>598,77±59,01^</u> 14,32±1,01^

<i>Поле СА4</i>		
Контроль	$5488,5 \pm 60,8$ $75,45 \pm 0,83$	$1860,2 \pm 73,7$ $24,55 \pm 0,53$
Ішемія-реперфузія 20 хв / 1 год	$3747,4 \pm 164,3$ $47,71 \pm 2,72$	$4644,2 \pm 300,8$ $52,29 \pm 1,30$
Ішемія-реперфузія 12 діб	$3279,5 \pm 68,8$ $72,75 \pm 1,47$	$1302,7 \pm 85,8$ $13,74 \pm 0,46$
Діабет	$5066,9 \pm 85,3^*$ $74,49 \pm 1,18^*$	$1832,3 \pm 102,6^*$ $25,51 \pm 0,98^*$
Діабет та ішемія- реперфузія 20 хв / 1 год	$5252,6 \pm 131,7$ $71,84 \pm 1,55$	$2091,3 \pm 128,0$ $28,16 \pm 1,17$
Діабет та ішемія- реперфузія 12 діб	$4791,5 \pm 82,6^{*\wedge}$ $66,14 \pm 1,37^{*\wedge}$	$2653,7 \pm 149,2^*$ $33,86 \pm 0,98^{*\wedge}$

Примітка. у чисельнику – сумарна щільність різних класів клітин на 1 мм²; у знаменнику – відсоток різних класів клітин; вірогідність різниці порівняно з: * - контролем; ^ - ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у контрольних тварин

зниження на 14 % частки нейроцитів та зростання в 1,9 раза частки апоптично змінених клітин.

На 12-ту добу спостереження зміни досліджуваних показників відбулися в усіх вивчених полях гіпокампа. Вони полягали в достовірному зниженні щільності розташування нейроцитів на 15, 11, 9 та 6 % у полях СА1, СА2, СА3, СА4 відповідно. При цьому мало місце зростання щільності апоптичних клітин в 1,6, 1,2, 1,4 раза в полях СА1, СА2, СА4 відповідно. Ці зміни знаходилися у відповідності з відсотковим перерозподілом вивчених клітин, що проявлялося зниженням відсотка нейроцитів та зростанням частки апоптичних клітин в 1,3 та 1,7 раза в полі СА1, на 3 та 18 % в полі СА2, 11 % та 1,3 раза - в полі СА4.

Висновки

1. Каротидна ішемія тривалістю 20 хв. з одно-годинною реперфузією знижує щільність розташування нейроцитів та підвищує щільність розташування апоптичних клітин у всіх досліджених полях гіпокампа, за винятком поля СА1. На 12-ту добу постішемічного періоду щільність розташування нейроцитів залишається зниженою стосовно контролю в полях СА1-СА4. Щільність апоптичних клітин у пізньому ішемічно-реперфузійному періоді в полі СА1 підвищується стосовно обох термінів спостереження, в полі СА2 і СА3 - стосовно контролю, в полі СА4 - залишається підвищеною стосовно контролю та знижується - стосовно раннього терміну спостереження.

2. Чотиримісячний цукровий діабет знижує щільність розташування нейроцитів та підвищує щільність апоптичних клітин у полях СА1, СА2,

СА4 і не змінює даних показників у полі СА3.

3. У щурів із цукровим діабетом реакція на короткотривалу ішемію-реперфузію головного мозку за щільністю розташування нейроцитів та апоптичних клітин подібна до такої в контрольних тварин лише в полі СА3, а в полях СА1, СА2, СА4 - відсутня. На 12-ту добу спостереження в полях гіпокампа СА1-СА4 щільність розташування нейроцитів стосовно показників у тварин із діабетом знижується, однак щільність апоптичних клітин при цьому зростає лише в полях СА1 і СА4, що може свідчити про загибель нейроцитів в полях СА2 і СА3 шляхом некрозу.

Перспективи подальших досліджень

Планується дослідити динаміку змін морфометричних параметрів нейроцитів гіпокампа за умов поєднання ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку та цукрового діабету.

Література. 1. Виленский Б.С. Современное состояние проблемы инсульта / Б.С. Виленский, Н.Н. Яхно // Вестн. РАМН. - 2006. - №9-10. - С.18-24. 2. Леньков О. М. Особенности перебігу ішемічно-реперфузійного пошкодження структур головного мозку при експериментальному цукровому діабеті в самців-щурів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія" / О. М. Леньков. - Чернівці, 2010. - 20 с. 3. Ткачук О. В. Церебральна реакція системи ліпопероксидація-антиоксидантний захист на двобічну каротидну ішемію-реперфузію в щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом / О. В. Ткачук // Клінічна та експериментальна патологія. - 2009. - Т. VIII, № 3 (29). - С. 105-108. 4. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on stroke / A. Ergul, A. Kelly-Cobbs, M. Abdalla, S.C. Fagan // Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets. - 2012. - Vol.12, №2. - P. 148-158. 5. Clinical and morphological correlations in acute ischemic stroke / A.S. Slujitoru, A.L. Enache, I.L. Pintea [et al.] // Rom. J. Morphol. Embryol. - 2012. - Vol.53, №4. - P. 917-926. 6. Damage to neurons and oligodendrocytes in the hippocampal CA1 sector after transient focal ischemia in rats / H. Uchida, Y. Fujita, M. Matsueda [et al.] // Cell. Mol. Neurobiol. - 2010. - Vol.30, №7. - P. 1125-1134. 7. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of

vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies / N. Sarwar, P. Gao, S.R. Seshasai [et al.] // *Lancet*. - 2010. - Vol.375, №9733. - P.2215-2222. 8. Inagaki K. Internal medicine and neurological diseases: progress in diagnosis and treatment. Topics: II neurological diseases related to diabetes mellitus; 2. Cerebral infarction, coma, hypoglycemia / K. Inagaki, M. Nagao, S. Oikawa // *Nihon Naika Gakkai Zasshi*. - 2012. - Vol.101, №8. - P. 2180-2187. 9. I s c h e m i c stroke and transient ischemic attack in young adults: risk factors, diagnostic yield, neuroimaging, and thrombolysis / R. Ji, L.H. Schwamm, M.A. Pervez, A.B. Singhal // *JAMA Neurol*. - 2013. - Vol.70, №1. - P.51-57. 10. Kolesnik Y. M. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement / Y. M. Kolesnik, A. V. Abramov // *Microscopy and Analysis*. - 2002. - № 5. - P. 12-16. 11. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study / M.J. O'Donnell, D. Xavier, L. Liu [et al.] // *Lancet*. - 2010. - Vol.376, №9735. - P.112-123. 12. Simmons B.B. Transient ischemic attack: Part II. Risk factor modification and treatment / B.B. Simmons, A.B. Gadegebeku, B. Cirignano // *Am. Fam. Physician*. - 2012. - Vol.86, №6. - P. 527-532.

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРFUЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Т.Н. Бойчук, О.М. Ніка

Резюме. Исследованы ранние и отсроченные последствия 20-минутной каротидной ишемии с реперфузией различной продолжительности на плотность расположения нейронов и апоптотических клеток гиппокампа у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Показано, что 20-минутная ишемия с одночасовой реперфузией снижает плотность расположения нейронов и повышает плотность расположения апоптотических клеток во всех исследованных полях гиппокампа, за исключением поля CA1. На 12-е сутки постишемического периода плотность расположения нейронов остается пониженной по отношению к контролю в полях CA1-CA4. Плотность апоптотических клеток в позднем ишемической-реперфузионном периоде остается повышенной во всех полях. Четырехмесячный сахарный диабет снижает плотность расположения нейронов и повышает плотность апоптотических клеток в полях CA1, CA2, CA4 и не меняет данных показателей в поле CA3. У крыс с сахарным диабетом реакция на кратковременную ишемию-реперфузию головного мозга по плотности расположения нейронов и апоптотических клеток сходна с таковой у контрольных животных только в поле CA3, а в полях CA1, CA2, CA4 - отсутствует. На 12-е сутки наблюдения в полях

гиппокампа CA1-CA4 плотность расположения нейронов относительно показателей у животных с диабетом снижается, однако плотность апоптотических клеток при этом возрастает только в полях CA1 и CA4, что может свидетельствовать о гибели нейронов в полях CA2 и CA3 путем некроза.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия головного мозга, сахарный диабет, гиппокамп, нейроны, апоптоз.

SPECIFIC CHARACTERISTICS OF DYNAMICS OF ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF HIPPOCAMPAL CELLS UNDER CONDITION OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

T.M.Boichuk, O.M.Nika

Abstract. Early and delayed consequences of 20-minutes carotid ischemia with reperfusion periods of various duration on the density of neurocytes and apoptotic cells of the hippocampus of rats with experimental diabetes mellitus were studied. It has been established that the 20-minutes ischemia with one hour reperfusion reduces the density of neurons, and increases the density of apoptotic cells in all studied hippocampal fields except the field CA1. On the 12th day of post-ischemic period the density of neurons location remains reduced relative to control in fields CA1-CA4. The density of apoptotic cells in late ischemic-reperfusion period remains increased in all fields. Four months diabetes mellitus reduces the density of the location of neurons and increases the density of apoptotic cells in the fields CA1, CA2, CA4, and does not change the data of parameters in the field CA3. In rats with diabetes mellitus response to short-term cerebral ischemia-reperfusion as to density location of neurons and apoptotic cells was similar to that in the control animals only in the field CA3, and in the fields CA1 CA2, CA4 such reaction is absent. On the 12th day of observation density of neurocytes location relative to indices in animals with diabetes reduced in the fields of the hippocampus CA1-CA4, however, the density of apoptotic cells increases in this case only in fields CA1 and CA4, which may be evidence of death of neurons in the CA2 and CA3 fields by means of necrosis.

Key words: cerebral ischemia-reperfusion, diabetes mellitus, hippocampus, neurocytes, apoptosis.

Higher State Educational Establishment of Ukraine

"Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

lin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №2 (52). - P.44-48.

Надійшла до редакції 15.06.2015

Рецензент – проф. С.С. Ткачук

© Т.М. Бойчук, О.М. Ніка, 2015