

УДК 616.831-005.4:616.379-008.64]:577.1-019

DOI: 10.22141/2224-0721.14.4.2018.140182

Бойчук Т.М., Ткачук С.С., Ніка О.М.

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

Рання та відстрочена реакція білка Hif-1 α в полях гіпокампа на ішемію-реперфузію в щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом

For cite: Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal. 2018;14(4):310-315. doi: 10.22141/2224-0721.14.4.2018.140182

Резюме. Актуальність. Роль транскрипційного фактора Hif-1 α в патогенезі гіпоксичних ушкоджень та цукрового діабету (ЦД) доведена, однак молекулярні механізми, що лежать в основі дисфункції даного фактора при поєднанні ЦД з ішемічно-реперфузійним ушкодженням головного мозку, залишаються нез'ясованими. **Мета.** Вивчення вмісту білка Hif-1 α в нейронах полів гіпокампа щурів з експериментальним ЦД у динаміці ішемічно-реперфузійного ушкодження головного мозку. **Матеріали та методи.** Дослідження виконано на 6-місячних щурах, яким у віці два місяці моделювали ЦД однократним введенням стрептозотину (60 мг/кг маси тіла) (Sigma, США). Порушення мозкового кровообігу відтворювали шляхом оклюзії обох сонних артерій протягом 20 хвилин. Уміст білка Hif-1 α визначали методом імунофлуоресценції після 20-хвилинної ішемії з односторонньою реперфузією та на 12-ту добу постішемічного періоду в полях гіпокампа CA1, CA2, CA3, CA4. **Результати.** У щурів без ЦД 20-хвилинна ішемія з односторонньою реперфузією підвищує вміст білка Hif-1 α в усіх досліджених полях гіпокампа. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в полях гіпокампа CA2-CA4 значення окремих досліджених показників активності транскрипційного фактора Hif-1 α продовжують зростати, а в полі CA1 — нормалізуються або наближаються до значень у тварин контрольної групи. У щурів із ЦД у ранньому постішемічному періоді в полі CA1 зміни вмісту білка Hif-1 α відсутні, в полі CA2 наявні ознаки зниження його активності, в полі CA3 — обмежені реакцією одного показника, в полі CA4 мають такий же характер, як і в контрольних щурах, за даних експериментальних умов. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в полі CA1 зростають усі показники активності транскрипційного фактора Hif-1 α , за абсолютними значеннями перевищуючи відповідні у тварин контрольної групи за тих же експериментальних умов; в полі CA2 і CA3 зміни досліджених параметрів обмежені порівняно з такими у тварин групи контролю; в полі CA4 знижуються показники, які у тварин групи контролю зазнали зростання. **Висновки.** ЦД обмежує реакцію білка Hif-1 α на ішемію-реперфузію в нейронах полів CA1-CA3 у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді та в нейронах полів CA2-CA4 — на 12-ту добу спостереження.

Ключові слова: цукровий діабет; ішемія-реперфузія головного мозку; білок Hif-1 α

Вступ

Загальновідомо, що ініціатором каскаду біохімічних і молекулярних подій, що призводять до загибелі нейронів у головному мозку під час його ішемічно-реперфузійного ушкодження, є невідповідність між постачанням кисню і потребою в ньому. У такій ситуації в тканині мозку спрацьовують захисні клітинні механізми, зокрема індукція різних

факторів транскрипції, серед яких важлива роль належить індукованому гіпоксією фактору Hif-1 α — транскрипційному регулятору кисневого гомеостазу і ключовому фактору формування адаптивних відповідей [1, 2]. Hif-1 α є потужним регулятором різних генів-мішеней, що збільшують еритропоез, стимулюють ангиогенез через активацію судинного ендотеліального фактора росту (VEGF), забезпечу-

© «Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal» / «Международный эндокринологический журнал» / «International Journal of Endocrinology» («Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal»), 2018
© Видавець Заславський О.Ю. / Издатель Заславский А.Ю. / Publisher Zaslavsky O.Yu., 2018

Для кореспонденції: Ніка Ольга Михайлівна, кандидат медичних наук, асистент кафедри нервових хвороб, психіатрії та медичної психології ім. С.М. Савенка, Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», пл. Театральна, 2, м. Чернівці, 58002, Україна; e-mail: nicka5@ukr.net; контактний тел.: +38 (050) 5373124.
For correspondence: Olha Nika, PhD, Assistant at the S.M. Savenko Department of Nervous Diseases, Psychiatry and Medical Psychology, State Higher Education Institution of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Teatralna sq., 2, Chernivtsi, 58002, Ukraine; e-mail: nicka5@ukr.net; phone +38 (050) 5373124.

ють адекватний метаболізм глюкози та її транспорт у нейрони, сприяють збереженню структури мітохондрій і виживанню клітин [3, 4].

Однак не всі дослідники оцінюють роль Hif-1 α так однозначно. Отримано експериментальні підтвердження не лише нейропротекторних, але й нейротоксичних ефектів Hif-1 α . Останні реалізуються через підвищення активності продукту гена p53 — білка p53 та інших чинників активації апоптозу [5]. Крім того, Hif-1 α бере участь у загибелі клітин шляхом некрозу, взаємодіючи з кальцієм і кальпаїном; він може посилювати набряк мозку, збільшуючи проникність гематоенцефалічного бар'єра [6–9]. Вважають, що захисні ефекти Hif-1 α реалізуються переважно при більш легкій гіпоксії, а нейротоксичні — при тяжкій.

Крім гіпоксії, потужним регулятором активності Hif-1 α є гіперглікемія [8]. У свою чергу, гіпоксія та гіперглікемія — основні чинники, що визначають хронічні ускладнення діабету. Наукові доробки останніх років вказують на те, що дестабілізація Hif-1 α , трансдукована гіперглікемією, проявляється втратою клітинної відповіді на гіпоксію при ускладненнях діабету, що, у свою чергу, негативно впливає на адаптацію клітин і тканин до низького вмісту кисню [10, 11]. Якщо механізми стабілізації Hif-1 α гіпоксією вивчені достатньо добре, то дестабілізація і зниження активності цього фактора за умов гіперглікемії залишаються дискусійними. Одним із недавно встановлених механізмів дестабілізації та функціональної репресії Hif-1 α при ЦД є вплив метилглюкозаль, який накопичується в умовах високого рівня глюкози і призводить до швидкої протеасом-залежної деградації Hif-1 α в умовах гіпоксії [10]. Незначна гіперглікемія активує сигналізацію Hif-1 α в деяких специфічних типах клітин, однак високий вміст глюкози інгібує її [12].

Як бачимо, роль транскрипційного фактора Hif-1 α в патогенезі гіпоксичних ушкоджень і ЦД доведена, хоча механізми його активації та дестабілізації продовжують активно вивчатися. Однак молекулярні механізми, що лежать в основі дисфункції даного фактора при поєднанні ЦД з ішемічно-реперфузійним ушкодженням головного мозку, залишаються нез'ясованими.

Мета дослідження — вивчити показники активності транскрипційного фактора Hif-1 α в нейронах полів гіпокампа шурів з експериментальним ЦД у динаміці ішемічно-реперфузійного ушкодження головного мозку.

Матеріали та методи

Дослідження проведені за умов моделювання двобічної каротидної ішемії 20-хвилинним кліпсуванням обох загальних сонних артерій із реперфузією різної тривалості в шурів без ЦД та з його наявністю. ЦД моделювали внутрішньочеревним введенням стрептозоточину (60 мг/кг) (Sigma, США) білим нелінійним самцям шурів віком два місяці [13]. Тривалість діабету становила 4 місяці, що в шурів є достатнім для формування діабетичної ен-

цефалопатії [13]. Ранні наслідки ішемічно-реперфузійного ушкодження гіпокампа вивчали після односторонньої реперфузії, а відстрочені — на 12-ту добу постішемічного періоду.

Моделювання ішемії та евантазію тварин здійснювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг внутрішньочеревно). Наявність ЦД верифікували визначенням вмісту глюкози в крові (глюкозооксидазним методом) і вивченням морфологічного стану підшлункової залози; експериментальні групи формували зі шурів, в яких рівень глікемії дорівнював або перевищував 10 ммоль/л.

Головний мозок якомога швидше вилучали в умовах низької температури, згідно з координатами стереотаксичного атласу [14] виділяли ділянки, що містять поля гіпокампа CA1, CA2, CA3 та CA4 і поміщали їх для 24-годинної фіксації в 10% розчин Буена. Після відповідної гістологічної проводки здійснювали заливку препаратів у парафінові блоки.

Білок Hif-1 α ідентифікували імунофлуоресцентним методом. Регідровані гістологічні зрізи інкубували впродовж 18 годин у вологій камері при 4 °C із первинними мишачими моноклональними антитілами до Hif-1 α шура (mouse IgG1 isotype; Santa Cruz, США) у розведенні 1 : 1000. Надлишок первинних антитіл відмивали в 0,1 М фосфатному буфері, здійснювали інкубацію зрізів упродовж 60 хвилин при 37 °C зі вторинними антитілами (кролячі антитіла до повної молекули IgG миші, кон'юговані з флуоресцеїну ізотіоціанатом; Santa Cruz, США) в розведенні 1 : 64, після чого зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину та фосфатного буфера (9 : 1) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Визначали концентрацію білка Hif-1 α , його питомий вміст і площу Hif-1 α -імунореактивного матеріалу (IPM). Опрацьовані гістологічні зрізи вивчали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Axioskop. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу Vidas-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [15].

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 за 0,05.

Результати

Результати дослідження подано в табл. 1 і 2. Встановлено, що в полі CA1 шурів без ЦД 20-хвилинна каротидна ішемія з односторонньою реперфузією спричинила зростання концентрації та питомого вмісту білка Hif-1 α у 2,1 та 1,9 раза відповідно. У полі CA2 за даного втручання відбулося зростання площі Hif-1 α -IPM в 1,6 раза, концентрації та питомого вмісту білка Hif-1 α — в 1,5 та 1,8 раза. Подібною була реакція клітин поля CA3, в якому площа Hif-1 α -IPM, концентрація та питомий вміст білка Hif-1 α зросли в 1,7; 1,3 та 2,3 раза відповідно. У полі CA4 шурів цієї експериментальної групи виявлено зростання концентрації та питомого вмісту білка Hif-1 α в 1,8 та 1,7 раза.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді в полях гіпокампа посилюється активність транскрипційного фактора Hif-1 α (судячи зі змін продукту його діяльності білка Hif-1 α).

На 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної каротидної ішемії в полі CA1 концентрація білка Hif-1 α залишалася підвищеною (на 20 %) стосовно значень показника в щурів групи контролю, хоча й вірогідно знижувалася стосовно раннього терміну в 1,8 раза. Питомий уміст білка Hif-1 α також був зниженим стосовно попереднього терміну в 1,8 раза і набув значень, притаманних тваринам групи

контролю. У полі CA2 в пізньому ішемічно-реперфузійному періоді всі три досліджувані показники залишалися підвищеними стосовно значень у контрольних тварин: площа Hif-1 α -IPM — у 2,2 раза, концентрація та питомий уміст білка Hif-1 α — на 13 % та у 2,1 раза відповідно. Однак динаміка їх відрізнялася: стосовно раннього постішемічного періоду концентрація білка Hif-1 α знизилася в 1,3 раза, його питомий уміст не змінився, а площа Hif-1 α -IPM зросла в 1,4 раза. У полі CA3 на 12-ту добу спостереження також усі досліджувані показники перевищували контрольні значення: площа Hif-1 α -IPM — у 2 рази, концентрація та питомий уміст

Таблиця 1. Вплив ішемії-реперфузії на реакцію білка Hif-1 α в нейронах полів гіпокампа CA1-CA2 контрольних щурів і тварин із цукровим діабетом ($M \pm m$)

Група спостереження	Концентрація білка Hif-1 α (E_{10})	Площа IPM на 10 000 мкм ²	Питомий уміст білка Hif-1 α (E_{10})
Поле CA1			
Контроль	0,0103 \pm 0,0003	11,412 \pm 0,953	0,110 \pm 0,026
Ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0212 \pm 0,0005*	10,871 \pm 0,828	0,207 \pm 0,028*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0120 \pm 0,0008**^	10,706 \pm 1,41	0,114 \pm 0,010^
Діабет	0,0259 \pm 0,0025*	13,552 \pm 1,120	0,251 \pm 0,027*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0290 \pm 0,0023	10,918 \pm 1,069	0,267 \pm 0,028
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0451 \pm 0,0017#&	22,028 \pm 2,066#&	0,491 \pm 0,044#&
Поле CA2			
Контроль	0,0076 \pm 0,0002	7,566 \pm 0,709	0,064 \pm 0,007
Ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0116 \pm 0,0007*	11,905 \pm 1,091*	0,116 \pm 0,016*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0086 \pm 0,0004**^	16,724 \pm 1,314**^	0,136 \pm 0,024*
Діабет	0,0112 \pm 0,0005*	11,071 \pm 1,043*	0,118 \pm 0,017*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0138 \pm 0,0009#	7,552 \pm 0,694#	0,103 \pm 0,017
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0199 \pm 0,0023#&	11,489 \pm 1,312#&	0,160 \pm 0,018#&

Примітки: тут і в табл. 2: 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.

Таблиця 2. Вплив ішемії-реперфузії на реакцію білка Hif-1 α в нейронах полів гіпокампа CA3-CA4 контрольних щурів і тварин із цукровим діабетом ($M \pm m$)

Група спостереження	Концентрація білка Hif-1 α (E_{10})	Площа IPM на 10 000 мкм ²	Питомий уміст білка Hif-1 α (E_{10})
Поле CA1			
Контроль	0,0072 \pm 0,0003	9,254 \pm 0,893	0,058 \pm 0,007
Ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0093 \pm 0,0003*	15,507 \pm 1,776*	0,133 \pm 0,020*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0132 \pm 0,0012**^	18,649 \pm 1,459**^	0,227 \pm 0,038**^
Діабет	0,0116 \pm 0,0005*	12,676 \pm 1,155*	0,142 \pm 0,023*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0189 \pm 0,0013#	13,869 \pm 1,861	0,167 \pm 0,022
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0159 \pm 0,0021#	20,746 \pm 2,248#&	0,204 \pm 0,034
Поле CA2			
Контроль	0,0068 \pm 0,0001	7,563 \pm 1,014	0,052 \pm 0,007
Ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0124 \pm 0,0006*	7,118 \pm 0,879	0,087 \pm 0,013*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0136 \pm 0,0011*	12,158 \pm 1,148**^	0,125 \pm 0,016**^
Діабет	0,0229 \pm 0,0021*	10,796 \pm 1,067*	0,151 \pm 0,021*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв/1 год	0,0299 \pm 0,0023#	12,733 \pm 1,542	0,252 \pm 0,027#
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0988 \pm 0,0092#&	6,776 \pm 1,327#&	0,177 \pm 0,025#&

білка Hif-1 α — в 1,8 та 3,9 раза. Однак два останні показники і стосовно раннього постішемичного періоду були підвищеними в 1,4 та 1,7 раза відповідно, а площа Hif-1 α -IPM залишалася на рівні такої в попередньому терміні. У полі СА4 стосовно показників у тварин контрольної групи площа Hif-1 α -IPM, концентрація та питомих уміст білка Hif-1 α були вищими в 1,6; 2,0, 2,4 раза. Динаміка полягала в зростанні порівняно з показниками в ранньому терміні спостереження площі Hif-1 α -IPM та питомого вмісту білка Hif-1 α в 1,7 та 1,4 раза.

Обговорення

Сукупний аналіз отриманих результатів дозволяє дійти висновку, що активація транскрипційного фактора Hif-1 α в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді притаманна усім дослідженим відділам гіпокампа. На 12-ту добу спостереження в усіх полях, крім поля СА1, за більшістю вивчених показників активність його продовжує зростати, а в полі СА1 — знижується. Це свідчить, що адаптивні механізми до 12-ї доби спостереження в полях СА2-СА4 залишаються напруженими, а в полі СА1 вони пригнічуються, що в цілому збігається з існуючою уявою про найбільшу вразливість до ушкоджуючих чинників саме цього поля.

У шурів із чотиримісячним ЦД в усіх полях виявлено ознаки активації транскрипційного фактора Hif-1 α . У полі СА1 це проявлялося вищими, ніж у контролі, значеннями концентрації та питомого вмісту білка Hif-1 α (у 2,5 та 2,3 раза), у полях СА2, СА3, СА4 — значеннями площі Hif-1 α -IPM, концентрації та питомого вмісту білка Hif-1 α (в 1,5; 1,5; 1,8 раза — у полі СА2; 1,4; 1,6; 2,4 раза — у полі СА3; 1,4; 3,4; 2,9 раза — у полі СА4). Ці результати дають підстави вважати, що в зазначеному терміні формування ЦД мають місце прояви ангіопатії, що створює гіпоксичні умови в досліджених відділах мозку. Кількісні відмінності ступеня зростання значень досліджених показників свідчать про різну схильність полів гіпокампа до формування діабетичної енцефалопатії.

У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді стосовно показників за діабету, неускладненого порушеннями церебрального кровообігу, в полі гіпокампа СА1 шурів із ЦД жодних вірогідних змін досліджуваних показників не виявлено, а отже, в цей період спостереження на відміну від тварин без діабету адаптивні механізми не спрацьовують. У полі СА2 в цьому терміні спостереження на 23 % зросла концентрація білка Hif-1 α при одночасному зниженні в 1,5 раза площі Hif-1 α -IPM; у полі СА3 в 1,6 раза зросла концентрація білка Hif-1 α ; у полі СА4 — концентрація та питомих уміст білка Hif-1 α — в 1,3 та 1,7 раза. Порівняння змін вивчених показників після 20-хвилинної ішемії/одногодинної реперфузії у тварин без діабету та за його наявності демонструє більш обмежену реакцію продукту транскрипційного фактора Hif-1 α у тварин останньої групи.

На 12-ту добу після моделювання каротидної ішемії порівняно з показниками за діабету, не

ускладненого порушеннями церебрального кровообігу, в полі гіпокампа СА1 відбулося зростання площі Hif-1 α -IPM, концентрації та питомого вмісту білка в 1,6; 1,7; 1,96 раза. Стосовно попереднього терміну ці показники були вищими в 2,0; 1,6; 1,8 раза. У полі СА2 стосовно показників за діабету залишалася підвищеною концентрація білка Hif-1 α (в 1,6 раза). Слід зазначити, що цей показник зріс і щодо раннього терміну спостереження (в 1,4 раза). Площа Hif-1 α -IPM та питомих уміст білка Hif-1 α в цей період повернулися до значень у тварин із діабетом без порушення мозкового кровообігу, а стосовно раннього терміну вони були вищими в 1,5 та 1,6 раза. Що стосується поля СА3, на 12-ту добу постішемичного періоду тут щодо показників за діабету були підвищеними концентрація білка Hif-1 α та площа Hif-1 α -IPM в 1,4 та 1,6 раза. Останній показник перевищував також значення в ранньому постішемичному періоді в 1,5 раза. У полі СА4 суттєво перевищувала значення як у тварин із ЦД, так і в ранньому постішемичному періоді концентрація білка Hif-1 α (в 4,3 та 3,3 раза). Беручи до уваги зниження в 1,6 та 1,9 раза значень площі Hif-1 α -IPM, можна думати, що концентрація цього білка зросла саме завдяки зниженню площі. Питомих уміст білка Hif-1 α повернувся до значень у тварин із ЦД і був нижчим, ніж у попередньому терміні, в 1,4 раза.

Висновки

1. У шурів без ЦД 20-хвилинна ішемія з одно-годинною реперфузією підвищує вміст білка Hif-1 α в усіх досліджених полях гіпокампа. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в полях гіпокампа СА2-СА4 значення окремих досліджених показників активності транскрипційного фактора Hif-1 α продовжують зростати, а в полі СА1 — нормалізуються або наближаються до значень у тварин контрольної групи.

2. У шурів із чотиримісячним ЦД виявлено вищі, ніж у тварин контрольної групи, значення активності Hif-1 α в усіх досліджених полях гіпокампа.

3. У шурів із діабетом у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді в полі СА1 зміни вмісту білка Hif-1 α відсутні, в полі СА2 наявні ознаки зниження його активності, в полі СА3 — обмежені реакцією одного показника, в полі СА4 мають такий же характер, як і в контрольних шурів за даних експериментальних умов. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в полі СА1 зростають усі показники активності транскрипційного фактора Hif-1 α , за абсолютними значеннями перевищуючи відповідні у тварин контрольної групи за тих же експериментальних умов; в полі СА2 і СА3 зміни досліджених параметрів обмежені порівняно з такими у тварин групи контролю; в полі СА4 знижуються показники, які у тварин групи контролю зростали.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

References

1. Singh N, Sharma G, Mishra V. Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 May;32(4):491-507. doi: 10.1007/s10571-012-9803-9.
2. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002;16(10):1151-1162. DOI: 10.1096/fj.01-0944rev.
3. Xu W, Xu R, Li X, Zhang H, Wang X, Zhu J. Down-regulating hypoxia-inducible factor-1 α expression with perfluorooctyl-bromide nanoparticles reduces early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Am J Transl Res.* 2016 May 15;8(5):2114-26.
4. Thelin EP, Frostell A, Mulder J, et al. Lesion Size Is Exacerbated in Hypoxic Rats Whereas Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha and Vascular Endothelial Growth Factor Increase in Injured Normoxic Rats: A Prospective Cohort Study of Secondary Hypoxia in Focal Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 2016 Mar 7;7:23. doi: 10.3389/fneur.2016.00023.
5. Chen C, Hu Q, Yan J, et al. Multiple effects of 2ME2 and D609 on the cortical expression of HIF-1 α and apoptotic genes in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model. *J Neurochem.* 2007 Sep;102(6):1831-1841. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04652.x.
6. Higashida T, Peng C, Li J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to brain edema after stroke by regulating aquaporins and glycerol distribution in brain. *Curr Neurovasc Res.* 2011 Feb;8(1):44-51.
7. Shenaq M, Kassem H, Peng C, et al. Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1 α after traumatic brain injury (TBI). *J Neurol Sci.* 2012 Dec 15;323(1-2):134-40. doi: 10.1016/j.jns.2012.08.036.
8. Chen C, Ostrowski RP, Zhou C, Tang J, Zhang JH. Suppression of hypoxia-inducible factor-1 α and its downstream genes reduces acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a rat model of cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2010 Jul;88(9):2046-55. doi: 10.1002/jnr.22361.
9. Higashida T, Kreipke CW, Rafols JA, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2011 Jan;114(1):92-101. doi: 10.3171/2010.6.JNS10207.
10. Bento CF, Fernandes R, Ramalho J, et al. The Chaperone-Dependent Ubiquitin Ligase CHIP Targets HIF-1 α for Degradation in the Presence of Methylglyoxal. *PLoS One.* 2010 Nov 29;5(11):e15062. doi: 10.1371/journal.pone.0015062.
11. Xiao H, Gu Z, Wang G, Zhao T. The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1 α Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies. *Int J Med Sci.* 2013 Aug 22;10(10):1412-21. doi: 10.7150/ijms.5630.
12. Catrina SB, Zheng X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016 Jan;32 Suppl 1:179-85. doi: 10.1002/dmrr.2742.
13. Tkachuk SS, Lenkov AM. Expression of Hif-1 α , p53 and Bcl-2 proteins in the brain under the conditions of bilateral carotid ischemia-reperfusion in experimental diabetes mellitus in male rats. *Klinichna ta eksperimental'na patologija.* 2010;2(32):111-113. (in Ukrainian).
14. König JF, Klippel PA. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1963. 162 p.
15. Kolesnik YM, Orlovsky MA. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement. *Microscopy and Analysis.* 2002;5:19-21.

Отримано 25.05.2018 ■

Бойчук Т.Н., Ткачук С.С., Ника О.М.

Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина

Ранняя и отсроченная реакция белка Hif-1 α в полях гиппокампа на ишемию-реперфузию у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом

Резюме. *Актуальность.* Роль транскрипционного фактора Hif-1 α в патогенезе гипоксических повреждений и сахарного диабета (СД) доказана, однако молекулярные механизмы, лежащие в основе дисфункции данного фактора при сочетании СД с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга, остаются невыясненными. *Цель.* Изучить содержание белка Hif-1 α в нейронах полей гиппокампа крыс с экспериментальным СД в динамике ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга. *Материалы и методы.* Исследование выполнено на 6-месячных крысах, которым в возрасте два месяца моделировали СД однократным введением стрептозотоцина (60 мг/кг массы) (Sigma, США). Нарушение мозгового кровообращения воспроизводили путем окклюзии обеих сонных артерий в течение 20 минут. Содержание белка Hif1- α определяли методом иммунофлуоресценции после 20-минутной ишемии с часовой реперфузией и на 12-е сутки постишемического периода

в полях гиппокампа CA1, CA2, CA3, CA4. *Результаты.* У крыс без СД 20-минутная ишемия с одночасовой реперфузией повышает содержание белка Hif-1 α во всех исследованных полях гиппокампа. На 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода в полях гиппокампа CA2-CA4 значения отдельных исследованных показателей активности транскрипционного фактора Hif-1 α продолжают расти, а в поле CA1 — нормализуются либо приближаются к значениям у животных контрольной группы. У крыс с СД в раннем постишемическом периоде в поле CA1 изменения содержания белка Hif-1 α отсутствуют, в поле CA2 имеются признаки снижения его активности, в поле CA3 — ограничены реакцией одного показателя, в поле CA4 носят такой же характер, как и у контрольных крыс при данных экспериментальных условиях. На 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода в поле CA1 увеличиваются все показатели активности транскрипционного фактора Hif-1 α , по абсолютным значениям превы-

шая соответствующие у животных контрольной группы при тех же экспериментальных условиях; в поле CA2 и CA3 изменения исследованных параметров ограничены по сравнению с таковыми у животных группы контроля; в поле CA4 снижаются показатели, которые у животных группы контроля повышались. **Выводы.** СД ограничивает

реакцию белка Hif-1 α на ишемию-реперфузию в нейронах полей CA1-CA3 в раннем ишемически-реперфузионном периоде и в нейронах полей CA2-CA4 — на 12-е сутки наблюдения.

Ключевые слова: сахарный диабет, ишемия-реперфузия головного мозга, белок Hif-1 α .

T.M. Boychuk, S.S. Tkachuk, O.M. Nika

State Higher Education Institution of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi, Ukraine

Early and delayed reaction of the Hif-1 α protein in the hippocampal fields on ischemia-reperfusion in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus

Abstract. Background. The role of the transcriptional hypoxia-inducible factor-1 α (Hif-1 α) in the pathogenesis of hypoxic damage and diabetes mellitus (DM) is proved, although molecular mechanisms underlying dysfunction of this factor, when DM is combined with ischemic-reperfusion damage of the brain, remain unknown. The purpose was to study the content of Hif-1 α protein in the hippocampal neurons of rats with experimental DM in the dynamics of ischemic-reperfusion damage of the brain. **Materials and methods.** The study was performed on 6-month-old rats with DM modeled by single administration of 60 mg/kg weight streptozotocin (Sigma, USA). The cerebrovascular disorders were reproduced by occlusion of both carotid arteries for 20 minutes. The content of Hif1- α protein was determined by immunofluorescence method after 20-minute ischemia with one-hour reperfusion, and on the 12th day of the post-ischemic period in the fields CA1, CA2, CA3, and CA4 of the hippocampus. **Results.** In rats without DM, 20-minute ischemia with one-hour reperfusion increases the content of Hif-1 α protein in all the fields of the hippocampus. On the 12th day of ischemic-reperfusion period, the values of certain examined indices of transcriptional Hif-1 α activity con-

tinue to increase in the hippocampal fields CA2-CA4, and in CA1 field they normalize or approach to the values of animals in the control group. In rats with DM during early post-ischemic period, there are no changes of Hif-1 α protein content in CA1 field, in CA2 field there are signs of its reduced activity, in CA3 field they are limited by the reaction of one index, in CA4 field they are similar to those of the control rats under experimental conditions. On the 12th day of ischemic-reperfusion period, all the indices of transcriptional Hif-1 α activity in CA1 field increase exceeding the corresponding indices in animals of the control group by absolute values under the same experimental conditions. In CA2 and CA3 fields, changes of the examined parameters are limited as compared to those in animals from the control group, in CA4 field, the values that were increased in the control group decrease. **Conclusions.** DM restricts the reaction of Hif-1 α protein on ischemia-reperfusion in the neurons of CA1-CA3 fields in the early ischemic-reperfusion period and in the neurons of CA2-CA4 fields — on the 12th day of observation.

Keywords: diabetes mellitus; cerebral ischemia-reperfusion; Hif-1 α protein