

МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМОЦИТІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВИМУ ДІАБЕТІ, УСКЛАДНЕНОМУ ІШЕМІЧНО-РЕПЕРФУЗІЙНИМ ПОШКОДЖЕННЯМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

О.В.Ткачук

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Досліджено вплив ішемії-реперфузії головного мозку на морфометричні характеристики тимоцитів у щурів із цукровим діабетом. Показано, що за ступенем змін морфометричних параметрів цукровий діабет найбільш суттєво модифікує реакцію малих тимоцитів на ішемію-реперфузію головного мозку в кірковій зоні тимуса та лімфобластів і малих тимоцитів – у мозковій.

Ключові слова: цукровий діабет, ішемія-реперфузія головного мозку, тимоцити.

Актуальність наукових досліджень, спрямованих на подолання проблеми цукрового діабету (ЦД), зумовлена невинним зростанням частоти захворюваності [1, 2]. За прогнозами, кількість хворих на цю недугу в ХХІ столітті подвоється, а за деякими даними – зростатиме вчетверо кожних десять років [3]. Серед багатьох факторів патогенезу ЦД І типу одним із найсуттєвіших вважають порушення аутолерантності [4, 5], в розвитку якого провідна роль належить тимусу [6, 7]. Виникнення імунорегуляторних порушень притаманне й одному з найчастіших ускладнень ЦД – ішемічно-реперфузійному пошкодженню головного мозку (ІРПГМ) [8, 9]. Якщо механізми імунної дисрегуляції при кожному з цих патологічних станів більш-менш досліджені, то за умов їх поєднання морфофункціональний стан тимоцитів не вивчений.

Мета дослідження: провести морфометричний аналіз субпопуляцій тимоцитів кіркової та мозкової зон за груднинної залози за умов двобічної каротидної ішемії-реперфузії на тлі 4-місячного ЦД.

Матеріал і методи. Для моделювання ЦД двомісячним щурам одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотонин (*Sigma*, США, 60 мг/кг) [10]. У дослід брали щурів з рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Тривалість ЦД – 4 місяці. У шестимісячних щурів контрольної групи і тварин з ЦД здійснювали 20-хвилинну оклюзію обох сонних артерій. Тварин виводили з експерименту на 12-ту добу постішемічного періоду.

Тимус 18 год фіксували в розчині Буена, здійснювали стандартне гістологічне оброблення, заливали в парафін, після регідрування готували серійні зрізи товщиною 5 мкм, фарбували гематоксиліном і еозином. У кортикальній та медулярній зонах залози визначали площу, периметр, коефіцієнти форми та елонгації лімфобластів, великих, середніх та малих лімфоцитів (незмінених та з ознаками деструкції) [11]. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (*Kontron Elektronik*, Німеччина). Ідентифікацію клітин у зображенні проводили за допомогою прикладних програм VIDAS-2.5, розроблених на основі макромови програмування VIDAS [1]. Результати досліджень оброблені за допомогою прикладних програм "Statistica" ("Statsoft", США). Статистичну значимість відмінностей оцінювали за *t*-критерієм Ст'юдента для незалежних вибірок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Результати дослідження. У лімфобластах кіркової зони тимуса контрольних щурів після ІРПГМ зріс коефіцієнт форми незмінених клітин та площа деструктивних клітин (табл. 1). ЦД не вплинув на морфометричні параметри незмінених тимоцитів, однак знизив площу і периметр, підвищив коефіцієнт форми клітин з ознаками деструкції. У тварин даної експериментальної групи ішемія-реперфузія мозку в незмінених клітинах збільшила лише коефіцієнт форми, однак суттєво змінила всі пара-

метри деструктивних клітин (збільшила площу та периметр, знизила коефіцієнти форми та елонгації). Суттєвіші наслідки у тварин контрольної групи ішемія-реперфузія мала в класі середніх незмінених тимоцитів, в яких збільшилися всі досліджувані морфометричні показники, за винятком периметра. Останній, як і всі

параметри клітин з ознаками деструкції, змін не зазнав. Тотальні, однак неоднозначні зміни виникли в нормальних клітинах даного класу тварин з ЦД – відбулося зменшення площі та периметра, однак коефіцієнти форми та елонгації зросли. Деструктивні клітини даного класу змін не зазнали. Морфометричні зміни середніх ти-

Таблиця 1

Вплив ішемії-реперфузії на морфометричні параметри лімфоцитів кіркової зони тимуса контрольних щурів та щурів з цукровим діабетом (M±m)

| Група спостереження | Площа, мкм ² | Периметр, мкм | Коефіцієнт форми | Коефіцієнт елонгації |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------|------------------|----------------------|
| Лімфобласти | | | | |
| Контроль | 35,17±0,43 | 22,57±0,14 | 0,866±0,003 | 0,802±0,006 |
| | 33,79±0,40 | 22,67±0,47 | 0,829±0,028 | 0,671±0,077 |
| Ішемія-реперфузія | 34,81±0,54 | 22,24±0,18 | 0,881±0,003 | 0,805±0,008 |
| | 36,70±1,06* | 24,51±1,83 | 0,762±0,024 | 0,528±0,005 |
| Цукровий діабет | 34,43±0,80 | 22,18±0,27 | 0,876±0,004 | 0,792±0,01 |
| | 12,99±0,06* | 13,35±0,03* | 0,893±0,0004* | 0,801±0,001 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 33,9±0,52 | 21,9±0,19 | 0,892±0,004^ | 0,82±0,01 |
| | 30,92±0,57^ | 24,11±1,68^ | 0,683±0,08^ | 0,51±0,0002^ |
| Великі лімфоцити | | | | |
| Контроль | 19,83±0,09 | 16,71±0,04 | 0,886±0,0007 | 0,815±0,0015 |
| | 20,04±0,26 | 17,38±0,12 | 0,830±0,003 | 0,647±0,003 |
| Ішемія-реперфузія | 19,28±0,09* | 16,39±0,03* | 0,897±0,0005* | 0,823±0,001* |
| | 19,40±0,29 | 16,95±0,13* | 0,845±0,003* | 0,653±0,004 |
| Цукровий діабет | 19,59±0,12 | 16,57±0,05* | 0,891±0,0008* | 0,817±0,002 |
| | 19,95±0,35 | 17,32±0,16 | 0,831±0,004 | 0,643±0,005 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 19,36±0,11 | 16,41±0,04^ | 0,899±0,0006^ | 0,827±0,002^ |
| | 19,72±0,36 | 17,15±0,17 | 0,839±0,004 | 0,646±0,005 |
| Середні лімфоцити | | | | |
| Контроль | 13,42±0,02 | 13,73±0,01 | 0,893±0,0005 | 0,814±0,001 |
| | 13,42±0,097 | 14,09±0,06 | 0,848±0,003 | 0,656±0,003 |
| Ішемія-реперфузія | 13,61±0,03* | 13,77±0,01 | 0,901±0,0003* | 0,819±0,001* |
| | 13,30±0,09 | 13,96±0,05 | 0,857±0,002* | 0,656±0,003 |
| Цукровий діабет | 13,16±0,03* | 13,56±0,01* | 0,898±0,0004* | 0,820±0,001* |
| | 13,22±0,09 | 13,97±0,05 | 0,850±0,002 | 0,655±0,003 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 13,31±0,03^ | 13,59±0,01 | 0,903±0,0003^ | 0,822±0,001 |
| | 13,18±0,11 | 13,89±0,06 | 0,857±0,002 ^ | 0,660±0,003 |
| Малі лімфоцити | | | | |
| Контроль | 9,22±0,04 | 11,32±0,03 | 0,898±0,001 | 0,809±0,002 |
| | 8,77±0,11 | 11,37±0,08 | 0,848±0,003 | 0,647±0,004 |
| Ішемія-реперфузія | 9,19±0,05 | 11,26±0,03 | 0,905±0,001* | 0,811±0,002 |
| | 9,18±0,14* | 11,54±0,09 | 0,861±0,002* | 0,655±0,003 |
| Цукровий діабет | 9,19±0,03 | 11,27±0,02 | 0,904±0,001* | 0,813±0,001 |
| | 8,94±0,11 | 11,43±0,07 | 0,855±0,002 | 0,653±0,003 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 9,03±0,04^ | 11,14±0,02^ | 0,907±0,001^ | 0,812±0,002 |
| | 8,92±0,11 | 11,38±0,07 | 0,861±0,002^ | 0,653±0,003 |
| Апоптотичні клітини | | | | |
| Контроль | 4,43±0,14 | 7,86±0,11 | 0,892±0,015 | 0,768±0,011 |
| Ішемія-реперфузія | 4,61±0,12 | 7,91±0,11 | 0,920±0,003 | 0,791±0,012 |
| Цукровий діабет | 4,58±0,10 | 7,89±0,09 | 0,917±0,005 | 0,786±0,009 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 4,63±0,06 | 7,95±0,06 | 0,916±0,003 | 0,771±0,008 |

Примітки (тут і в таблиці 2): у чисельнику – параметри незмінених клітин; у знаменнику – параметри клітин з ознаками деструкції; вірогідність відмінностей: * – у контрольних тварин; ^ – у тварин з цукровим діабетом.

моцитів у відповідь на ішемію-реперфузію мозку в щурів з ЦД майже не відрізнялися від тих, що мали місце в контрольних щурів.

У контрольних щурів ішемія-реперфузія мозку підвищила коефіцієнт форми незмінених та деструктивних малих тимоцитів і площу деструктивних. ЦД незначно вплинув на досліджувані параметри даного класу клітин – збільшив лише коефіцієнт форми, однак ішемізація

мозку у тварин даної групи призвела до суттєвих змін – знизилася площа та периметр клітин і зріс їх коефіцієнт форми.

Апоптотичні клітини у всіх експериментальних групах мали однакові морфометричні характеристики. У лімфобластах мозкової зони тимуса з усіх зазначених втручань лише ішемія-реперфузія мозку в контрольних щурів мала вплив на досліджені параметри, а саме – збіль-

Таблиця 2

Вплив ішемії-реперфузії на морфометричні параметри лімфоцитів мозкової зони тимуса контрольних щурів та щурів з цукровим діабетом (M±m)

| Група спостереження | Площа, мкм ² | Периметр, мкм | Коефіцієнт форми | Коефіцієнт елонгації |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------|------------------|----------------------|
| Лімфобласти | | | | |
| Контроль | 34,77±0,57 | 22,41±0,20 | 0,868±0,004 | 0,775±0,009 |
| | 36,061±3,57 | 24,45±1,05 | 0,750±0,021 | 0,524±0,030 |
| Ішемія-реперфузія | 38,91±1,21* | 23,61±0,35* | 0,867±0,005 | 0,766±0,013 |
| | 35,4±2,40 | 24,2±0,69 | 0,75±0,02 | 0,52±0,02 |
| Цукровий діабет | 36,99±1,09 | 23,12±0,32 | 0,862±0,004 | 0,760±0,012 |
| | 41,35±2,28 | 26,18±1,07 | 0,762±0,025 | 0,535±0,026 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 40,00±0,15 | 23,93±0,34 | 0,867±0,004 | 0,773±0,011 |
| | 38,59±2,70 | 25,58±0,98 | 0,736±0,019 | 0,533±0,014 |
| Великі лімфоцити | | | | |
| Контроль | 19,37±0,09 | 16,55±0,041 | 0,884±0,0007 | 0,806±0,002 |
| | 20,41±0,21 | 17,69±0,10 | 0,817±0,003 | 0,631±0,003 |
| Ішемія-реперфузія | 19,06±0,10* | 16,34±0,04* | 0,892±0,001* | 0,807±0,002 |
| | 19,78±0,20* | 17,31±0,09* | 0,826±0,003* | 0,623±0,004 |
| Цукровий діабет | 19,4±0,106 | 16,5±0,045 | 0,889±0,0008* | 0,810±0,002 |
| | 20,05±0,24 | 17,41±0,11 | 0,827±0,003* | 0,635±0,003 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 18,99±0,08^ | 16,30±0,03^ | 0,894±0,0007^ | 0,810±0,002 |
| | 19,49±0,18 | 17,13±0,08 | 0,832±0,003 | 0,636±0,003 |
| Середні лімфоцити | | | | |
| Контроль | 13,55±0,03 | 13,81±0,01 | 0,890±0,0005 | 0,804±0,001 |
| | 13,52±0,07 | 14,24±0,043 | 0,837±0,002 | 0,639±0,003 |
| Ішемія-реперфузія | 13,6±0,035 | 13,8±0,018 | 0,897±0,0005* | 0,805±0,001 |
| | 13,55±0,08 | 14,20±0,04 | 0,843±0,002 | 0,642±0,003 |
| Цукровий діабет | 13,38±0,03* | 13,697±0,02* | 0,895±0,0005* | 0,808±0,001 |
| | 13,46±0,073 | 14,21±0,044 | 0,837±0,002 | 0,636±0,003 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 13,7±0,033 | 13,8±0,017 | 0,898±0,0004^ | 0,809±0,001 |
| | 13,51±0,07 | 14,24±0,04 | 0,840±0,002 | 0,639±0,003 |
| Малі лімфоцити | | | | |
| Контроль | 8,96±0,05 | 11,14±0,37 | 0,901±0,001 | 0,802±0,002 |
| | 8,96±0,109 | 11,49±0,078 | 0,848±0,002 | 0,638±0,003 |
| Ішемія-реперфузія | 8,82±0,06 | 11,02±0,04* | 0,906±0,001* | 0,798±0,002 |
| | 8,78±0,12 | 11,29±0,08 | 0,859±0,002* | 0,648±0,003 |
| Цукровий діабет | 8,82±0,04* | 11,03±0,03* | 0,904±0,001* | 0,807±0,002 |
| | 9,05±0,09 | 11,52±0,07 | 0,852±0,002 | 0,644±0,003 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 8,61±0,06^ | 10,89±0,04^ | 0,904±0,001^ | 0,799±0,002^ |
| | 8,67±0,10^ | 11,28±0,07^ | 0,849±0,002 | 0,637±0,003 |
| Апоптотичні клітини | | | | |
| Контроль | 4,41±0,12 | 7,72±0,11 | 0,918±0,003 | 0,792±0,008 |
| Ішемія-реперфузія | 4,35±0,08 | 7,67±0,08 | 0,923±0,002 | 0,789±0,006 |
| Цукровий діабет | 4,65±0,056 | 7,95±0,053 | 0,922±0,002 | 0,799±0,005 |
| Цукровий діабет та ішемія-реперфузія | 4,39±0,069^ | 7,75±0,065^ | 0,909±0,004^ | 0,762±0,006^ |

шення площі та периметра (табл. 2). Однак уже великі лімфоцити починають активно реагувати на всі види експериментальних втручань. Ішемія-реперфузія головного мозку у тварин контрольної групи і тварин з ЦД призвела до зменшення площі та периметра даних клітин і зростання коефіцієнта форми. Відмінністю було те, що у контрольних щурів такими ж змінами відреагували й деструктивні клітини, чого не виявлено у тварин з ЦД.

Менш суттєвою на всі втручання була реакція середніх тимоцитів – лише ЦД призвів до зниження площі та периметра незмінених клітин. Крім того, при всіх експериментальних втручаннях підвищився коефіцієнт форми останніх. Реакція найбільш зрілих малих тимоцитів на ішемію-реперфузію мозку в контрольних щурів полягала в зниженні периметра та зрос-

танні коефіцієнта форми незмінених клітин, у тварин з ЦД – у зменшенні площі, периметра деструктивних і нормальних клітин та коефіцієнта елонгації останніх. ЦД зменшив площу, периметр та збільшив коефіцієнт форми незмінених клітин. У тварин з ЦД на ішемію-реперфузію зниженням величини всіх досліджених параметрів прореагували апоптотичні клітини.

Висновок та перспективи подальших досліджень. 1. За ступенем змін морфометричних параметрів цукровий діабет найбільш суттєво модифікує реакцію малих тимоцитів на ішемію-реперфузію головного мозку в кірковій зоні тимуса та лімфобластів і малих тимоцитів – у мозковій. 2. Доцільно провести порівняльний аналіз реакції структури лімфоїдної популяції тимуса на ішемію-реперфузію головного мозку в інтактних щурів та щурів із цукровим діабетом.

Література

1. Виленский Б.С. Современное состояние проблемы инсульта / Б.С.Виленский, Н.Н.Яхно // *Вестн. РАМН*. – 2006. – № 9-10. – С. 18-24.
2. Donnan G.A. Stroke / G.A.Donnan, M.Fisher, M.Macleod // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371, № 9624. – P. 1612-1623.
3. Suwanwela N. Acute ischemic stroke. Overview of recent therapeutic developments / N.Suwanwela, W.J.Koroshetz // *Ann. Rev. Med.* – 2007. – Vol. 58. – P. 89-106.
4. Csorba T.R. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes / T.R.Csorba, A.W.Lyon, M.D.Hollenberg // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2010. – Vol. 47, № 2. – P. 51-71.
5. Stadinski B. Molecular targeting of islet autoantigens / B.Stadinski, J.Kappler, G.S.Eisenbarth // *Immunity*. – 2010. – Vol. 32, № 4. – P. 446-456.
6. Колесник Ю.М. Пошук шляхів корекції дисфункції тимуса у щурів з експериментальним цукровим діабетом / Ю.М.Колесник, О.М.Камишний, А.В.Абрамов // *Фізіол. ж.* – 2008. – № 3. – С. 28-35.
7. Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes / V.Geeßen, F.Brilot, C.Louis [et al.] // *Rev. Med. Liege*. – 2005. – Vol. 60. – P. 291-296.
8. Прогностическое значение маркеров воспаления и аутоантител к нейроспецифическим антигенам у больных с острым ишемическим инсультом / Н.Ю.Рудева, П.П.Камчатнов, Т.К.Люкова // *Аллергол. и иммунол.* – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 211.
9. Скворцова В.И. Ишемический инсульт / В.И.Скворцова, М.А.Евзельман. – Орел, 2006. – 404 с.
10. Bassirat M. Short- and long-term modulation of microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats by glycosylated products / M.Bassirat, Z.Khalil // *J. Diabet. Complicat.* – 2008. – Vol. 22, № 6. – P. 371-376.
11. Алгоритм автоматичного аналізу лімфоїдної популяції тимуса / А.В.Абрамов, Ю.М.Колесник, В.А.Любомирська, О.М. Камисний // *Вісн. морфол.* – 2002. – № 2. – С. 361-362.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ, ОСЛОЖНЕННОМ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме. Исследовано влияние ишемии-реперфузии головного мозга на морфометрические характеристики тимоцитов у крыс с сахарным диабетом. Показано, что по степени изменений морфометрических параметров сахарный диабет наиболее существенно модифицирует реакцию малых тимоцитов на ишемию-реперфузию головного мозга в корковой зоне тимуса и лимфобластов и малых тимоцитов – в мозговой.

Ключевые слова: сахарный диабет, ишемия-реперфузия головного мозга, тимоциты.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTIC OF THYMOCYTES IN RATS WITH DIABETES MELLITUS, COMPLICATED BY ISCHEMIA-REPERFUSION BRAIN DAMAGE

Abstract. The influence of brain ischemia-reperfusion on the morphometric characteristics of thymocytes in rats with diabetes mellitus has been investigated. It has been shown that according to the degree of changes of morphometric parameters diabetes most significantly modifies the response of small thymocytes to ischemia-reperfusion of the brain in the cortical zone of the thymus and lymphoblasts and small thymocytes – in the medullary zone.

Key words: diabetes mellitus, brain ischemia-reperfusion, thymocytes.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 02.08.2011 р.

Рецензент – проф. В.Ф.Мислицький (Чернівці)