

УДК 616.831.31-005.4-06:616.379-008.64]-092.9

Т.І.Кметь

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

МОДИФІКУЮЧИЙ ВПЛИВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ НА ЧУТЛИВІСТЬ КЛІТИН ЛОБОВОЇ ЧАСТКИ КОРИ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ-САМЦІВ ДО ІШЕМІЧНО-РЕПЕРФУЗІЙНОГО ПОШКОДЖЕННЯ

Резюме. За результатами експериментального дослідження встановлено, що ішемія-реперфузія знижує щільність нервових і підвищує щільність апоптичних клітин в корі лобової частки головного мозку в обидва терміни спостереження та знижує щільність гліальних клітин на 12-ту добу. За умов ішемічно-реперфузійного пошкодження виникає збільшення площі нейронів та апоптично змінених клітин у ранньому постішемічному періоді. На 12-ту добу після моделювання каротидної ішемії-реперфузії знижується площа нервових та гліальних клітин і зростає – апоптичних. Виявлено, що у тварин зі стрептозотоцин-індукованим діабетом зменшується сумарна щільність та відсоткового співвідношення нервових та гліальних клітин лобової частки кори великих півкуль та зростає у апоптичних. Доведено, що площа нервових клітин зростає у груп тварин із цукровим діабетом і у пізньому ішемічно-реперфузійному періоді та знижується у ранньому періоді. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді тварин з цукровим діабетом знижується коефіцієнт форми та елонгації апоптичних клітин, а у пізньому періоді щурів з діабетом дані коефіцієнти зростають у нервових клітинах.

Ключові слова: головний мозок, ішемія-реперфузія, цукровий діабет, нейрони, глія, апоптоз.

Цукровий діабет (ЦД) становить на сьогодні важливу медико-соціальну проблему і поширеність його у світі має ознаки глобальної неінфекційної епідемії [1]. За оцінками спеціалістів, до 2030 р. кількість хворих на цю хворобу може досягти 552 млн. [2]. В Україні станом на 1 січня 2013 року було зареєстровано 1,3 млн. пацієнтів із ЦД [3]. Одним із найбільш частих ускладнень цієї патології є гостре порушення мозкового кровообігу, яке призводить до тривалої непрацездатності або глибокої інвалідизації хворих [4]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у світі від інсульту щорічно помирають більш ніж 4,7 млн. людей, що обумовлює актуальність подальшого пошуку високоефективних нейропротективних засобів, а також вивчення молекулярних механізмів розвитку церебральної патології [5]. Пусковим механізмом ранньої ішемічної загибелі нейронів є енергетичний дефіцит, ініціюючий глутамат-кальцієвий каскад – вивільнення збуджувальних аміноацидеригічних нейротрансмітерів – аспартату та глутамату і внутрішньоклітинне накопичення іонів кальцію [6]. У пізньому періоді ішемії відбуваються зміни з боку геному з включенням генетично запрограмованих молекулярних механізмів, дисфункція астроцитарно-гліаль-

ного пулу та ініціація нейроапоптозу [7, 8]. Із джерел літератури відомо [4, 9, 10], що ЦД призводить до ішемії головного мозку і внаслідок утворення вільних радикалів виникає ушкодження нервових та гліальних клітин кори головного мозку. Однак ступінь реагування на дане втручання окремих клітин (нейронів та глії), а також процеси апоптозу в ранні та пізні періоди ішемії-реперфузії в різних частках півкуль кори головного мозку, зокрема лобової (соматомоторної) залишаються недостатньо вивченими.

Мета дослідження: вивчити динаміку змін щільності розташування нервових, гліальних та апоптичних клітин кори лобової частки великих півкуль головного мозку та їх морфометричні характеристики в щурів-самців із ЦД у різні періоди ішемічно-реперфузійного пошкодження мозку.

Матеріал та методи. Дослідження проведено на 66 самцях білих нелінійних щурів шести груп: 1. Контрольні тварини; 2. Щури, яким здійснювали 20-ти хвилинну двобічну каротидну ішемію з одногодінною реперфузією (ДКІР); 3. Тварини, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після завершення періоду ішемії; 4. Щури з ЦД; 5. Лабораторні тварини з ЦД, яким моделювали 20-ти хвилинну ДКІР; 6. Щури з ЦД, яких ви-

водили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-ти хвилинної ДКІР.

Цукровий діабет моделювали одноразовим внутрішньочеревним уведенням стрептозоточину (Sigma, США) у дозі 60 мг/кг двомісячним самцям білих лабораторних щурів [11]. Експериментальні групи формували з тварин із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Тривалість ЦД – 4 місяці. Для виконання ДКІР під внутрішньочеревним наркозом (каліпсол, 75 мг/кг) переднім серединним шийним доступом виділяли обидві загальні сонні артерії, на які накладали кліпси упродовж 20-ти хвилин, після чого кровотік по судинах відновлювали для досягнення реперфузії [12]. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії мозку частину тварин виводили з експерименту через 1 годину після завершення реперфузійного періоду, а відстрочених – на 12-ту добу. Евтаназію тварин здійснювали під каліпсовим наркозом, забирали головний мозок за координатами стереотаксичного атласу, виділяли кору лобової частки і фіксували її у 10% розчині Буена упродовж 24 годин. Після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи товщиною 5,0 мкм. Зображення кори мозку вивчали в спектрі люмінесценції на флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP (Zeiss, Німеччина) та за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4722 (COHU Inc., США) уводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-

386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Морфометричний аналіз клітин лобової частки неокортексту здійснювали в автоматичному режимі за допомогою програми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування VIDAS-2,5 (Kontron Elektronik, Німеччина) [13]. Визначали наступні характеристики нервових, гліальних та апоптичних клітин: сумарну (кількість клітин на 1,0 мм² площі зрізу кори мозку) та відносну (%) щільність розподілу окремих класів клітин, площу (мкм²), коефіцієнти форми та елонгації.

Усі дослідження виконані з дотриманням Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах (1986).

Цифрові результати експериментальних досліджень опрацьовані на персональному комп'ютері в прикладних програмах "Statistica 6.0" та "SPSS 13" із використанням параметричного t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення.

За результатами експериментальних досліджень встановлено (табл. 1 і 2), що ішемічно-реперфузійне ураження різних класів клітин лобової частки кори півкуль головного мозку має неоднозначний вплив. Встановлено, що щільність нервових клітин у ранньому постішемічному періоді вірогідно зменшилася у 1,1 раза відносно показників у контрольних тварин, тоді як щільність гліальних клітин у цей період змін не зазнала. У даному терміні спостереження суттєво зросла щільність

Таблиця 1

Щільність різних класів клітин у корі лобової частки півкуль щурів зі стрептозоточин-індукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку(на 1 мм²) (M±m)

Група спостереження	Класи клітин		
	Нервові клітини	Гліальні клітини	Апоптичні клітини
Контроль	848,40±8,68 70,74±0,66	304,59±9,68 23,97±0,64	68,74±5,06 5,29±0,38
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	784,70±16,40* 62,16±1,01*	326,04±13,13 24,41±0,88	176,66±10,99* 13,43±0,78*
Ішемія-реперфузія (12 діб)	534,29±23,14*^ 41,75±1,79*^	233,89±13,93*^ 17,36±0,96*^	549,99±28,33*^ 40,89±1,85*^
Діабет	754,26±18,69* 65,46±1,29*	207,18±12,39* 17,19±0,98*	207,18±12,17* 17,34±0,94*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	710,05±19,43 65,91±1,10	189,13±9,80 17,46±0,85	180,32±11,38 16,63±1,00
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	730,79±19,63 65,41±1,34	195,89±11,40 17,13±0,96	198,06±12,16 17,46±1,01

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

Таблиця 2

Морфометричні параметри різних класів клітин у корі лобової частки півкуль щурів зі стрептозоточин-індукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m)

Група спостереження	Площа, мкм ²	Коефіцієнт форми	Коефіцієнт елонгації
Нервові клітини			
Контроль	101,88±1,16	0,790±0,002	0,712±0,002
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	115,93±1,72*	0,764±0,003*	0,664±0,003*
Ішемія-реперфузія 12 діб	81,21±1,67*^	0,766±0,005*	0,722±0,005^
Діабет	113,34±1,95*	0,782±0,003	0,659±0,004*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	91,61±1,60#	0,772±0,004	0,646±0,004#
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	117,95±2,11&	0,798±0,003#&	0,737±0,003#&
Гліальні клітини			
Контроль	19,37±0,17	0,712±0,005	0,673±0,005
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	19,16±0,20	0,730±0,006*	0,658±0,007
Ішемія-реперфузія (12 діб)	18,30±0,32*^	0,65±0,01*^	0,653±0,009
Діабет	19,48±0,33	0,735±0,009*	0,68±0,01
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	19,40±0,27	0,711±0,009	0,650±0,009#
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	19,67±0,34	0,731±0,009	0,696±0,009&
Апоптичні клітини			
Контроль	27,29±1,65	0,736±0,009	0,634±0,011
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	34,83±2,10*	0,706±0,009*	0,58±0,01*
Ішемія-реперфузія (12 діб)	35,46±0,85*	0,687±0,006*	0,590±0,006*
Діабет	31,73±1,74	0,729±0,009	0,62±0,01
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	35,41±1,75	0,693±0,011#	0,573±0,012#
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	31,17±1,77	0,71±0,01	0,597±0,011

Примітка. – 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.

апоптичних клітин – у 2,6 раза. Також вірогідно змінилось в цей період і відсоткове співвідношення досліджених видів клітин – у 1,15 раза знизилася частка нейронів тоді як частка апоптичних клітин зросла у 2,5 раза при незмінному відсотку гліальних. Отже, в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді суттєвих апоптичних змін зазнають нервові клітини. У пізньому постішемічному періоді щільність апоптично змінених клітин підвищилась у 8 разів стосовно такої в контрольних щурів і в 3 раза – стосовно показника в ранньому терміні спостереження. У даному терміні спостереження щільність нервових та гліальних клітин зменшилася на 37% та 23% відповідно стосовно

показника в контрольних щурів і на 32% та 28% – стосовно раннього терміну спостереження. Аналіз відсоткового співвідношення різних класів клітин кори лобової частки півкуль головного мозку показав вірогідне зниження частки нейроцитів та гліальних клітин як щодо показників у контролі, так і стосовно раннього терміну (на 40% і 33% та на 28% і 29% відповідно) із суттєвим зростанням частки апоптичних клітин (у 7,7 раза та 3 рази відповідно). Отже, до 12-ї доби постішемічного періоду загибель клітин наростає і до даного терміну спостереження, ймовірно, цей процес не завершується.

Дослідження морфометричних параметрів

різних клітин кори головного мозку в ранньому постішемичному періоді показало, що площа нервових та апоптично змінених клітин вірогідно збільшилася на 14% та 28% відповідно відносно показників у контрольних тварин, тоді як гліальні клітини змін не зазнали. У пізньому ішемічно-реперфузійному періоді площа нейронів та глії вірогідно знизилася на 20% та 6% відповідно стосовно показників у контрольних щурів і на 30% та 6% – стосовно раннього терміну спостереження. Площа апоптично змінених клітин у віддалений термін спостереження зросла на 30% відносно показника в контрольній групі тварин.

У ранньому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку виявлено зниження коефіцієнту форми нервових та апоптичних клітин кори лобової частки півкуль на 4% та 5% відповідно щодо показників у контрольних тварин, а в гліальних клітинах спостерігалось зростання даного параметра на 3%. Коефіцієнт елонгації в досліджуваному терміні ішемії в нейронах та деструктивно змінених клітинах зменшився на 7% та 9% відповідно відносно показників в інтактної групи лабораторних щурів, а в нейроглії цей показник не змінився.

В умовах пізнього ішемічно-реперфузійного періоду коефіцієнт елонгації нервових клітин підвищився на 9% стосовно раннього терміну спостереження, а апоптичних клітин, навпаки, зменшився на 7% відносно показників у контрольній групі тварин. У гліальних клітинах кори лобової частки великих півкуль головного мозку вірогідних змін даного показника не виявлено.

За умов стрептозотоцин-індукованого діабету сумарна щільність нервових та гліальних клітин лобової частки кори великих півкуль зменшилась у 1,1 та 1,5 рази відповідно, відносно показників у інтактної групи тварин, що може бути свідченням загибелі даних типів клітин. Проте щільність апоптичних клітин, навпаки, зросла у 3 рази по відношенню до контрольної групи лабораторних щурів. Аналіз відсоткового співвідношення різних класів клітин кори досліджуваної частки півкуль головного мозку також показав зниження нервових та гліальних клітин на 8% та 29% відповідно та підвищення апоптичних клітин на 27% відносно показників у контрольній групі тварин.

При вивченні морфометричних параметрів різних клітин лобової частки кори головного мозку встановлено, що площа нейронів у щурів із діабетом збільшилася на 11% відносно показників у контрольних тварин. Проте, у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із діабетом даний параметр зменшився на 19% стосовно тварин

із ЦД. У пізньому ішемічно-реперфузійному періоді щурів із діабетом площа нейронів збільшилась на 29% стосовно раннього терміну спостереження. Площа гліальних та апоптичних клітин досліджуваної частки кори півкуль головного мозку у тварин з ЦД та поєднанні його з різними термінами постішемії не зазнала змін.

За умов стрептозотоцин-індукованого діабету коефіцієнт форми збільшився лише у гліальних клітинах лобової частки кори великих півкуль головного мозку на 3% відносно контрольної групи тварин.

У ранньому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку тварин із ЦД виявлено зниження на 5% коефіцієнту форми тільки у апоптичних клітинах кори лобової частки півкуль відповідно до щурів із ЦД.

Моделювання ЦД у досліджуваній ділянці кори півкуль супроводжувалось тільки зниженням коефіцієнту елонгації нервових клітин на 8% порівняно з контрольною групою тварин. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із діабетом даний показник у нервових, гліальних та апоптичних клітинах зменшився на 2%, 5% і 8% відповідно відносно аналогічних показників у тварин із діабетом. В умовах пізнього ішемічно-реперфузійного періоду щурів із діабетом коефіцієнт елонгації нейронів та глії збільшився на 12% та 7% відповідно стосовно показників у тварин із діабетом і на 14% у нервових клітинах стосовно раннього терміну спостереження.

Висновки. 1. При експериментальному дослідженні ішемія знижує щільність нервових і підвищує щільність апоптичних клітин в корі лобової частки головного мозку в обидва терміни спостереження та знижує щільність гліальних клітин на 12-ту добу. 2. За умов ішемічно-реперфузійного пошкодження виникає збільшення площі нейронів та апоптично змінених клітин у ранньому постішемичному періоді. На 12-ту добу після моделювання каротидної ішемії-реперфузії знижується площа нервових та гліальних клітин і зростає – апоптичних. 3. У тварин зі стрептозотоцин-індукованим діабетом зменшується сумарна щільність та відсоткового співвідношення нервових та гліальних клітин лобової частки кори великих півкуль та зростає у апоптичних. 4. Площа нервових клітин лобової частки кори півкуль головного мозку зростає у груп тварин із цукровим діабетом і у пізньому ішемічно-реперфузійному періоді та знижується у ранньому періоді. 5. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із цукровим діабетом знижується коефіцієнт форми та елонгації апоптичних клітин, а у пізньому

періоді щурів з діабетом дані коефіцієнти зростають у нервових клітинах лобової частки кори півкуль головного мозку.

Перспективи подальших досліджень. Результати свідчать про перспективність дослід-

жень механізмів ішемічно-реперфузійних пошкоджень інших часток кори півкуль головного мозку на тлі цукрового діабету, знання яких може стати основою їх патогенетичної корекції.

Список використаної літератури

1. Кравчун Н. О. Нові можливості в лікуванні цукрового діабету / Н.О. Кравчун, І.П. Романова, Т.М. Тихонова [та ін.] // *Международ. эндокрин. ж.* – 2013. – № 6 (54). – С. 77-79.
2. Kozak V. M. *International Diabetes Federation (IDF) highlights growing global impact of diabetes in 5th edition of the Diabetes Atlas* / V.M. Kozak, M.J. Tjota, K.L. Close // *J. of Diabetes.* – 2012. – Vol. 4. – P. 8-17.
3. Чернобров А.Д. Довідник основних показників діяльності ендокринологічної служби за 2012 рік / А.Д. Чернобров // *Ендокринологія.* – 2013. – Т. 18, № 1. – С. 36.
4. Шведський В. В. Експериментальне порушення мозкового кровообігу на тлі алоксанового цукрового діабету: характеристика моделі / В.В. Шведський, О.А. Ходаківський // *Бук. мед. вісник* – 2012. – Т. 16, № 1 (61). – С. 150–156.
5. Зозуля І.С. Гострі порушення мозкового кровообігу як критичні стани в невропатології / І.С. Зозуля, В.І. Боброва // *Укр. невролог. ж.* – 2006. – № 1. – С. 5-8.
6. Shanmuga Sundaram R. *The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology* / R. Shanmuga Sundaram, L. Gowtham, Bhabani S. Ayak // *Asian J. of Pharmac. and Clin. Research.* – 2012. – Vol. 5, № 2. – P. 1–7.
7. Галиця В.В. Вплив бензилового естеру 2-(3,4-дигідро-3-оксо-2Н-[1,2,4]-триазино[4,3-С]хіназолін-4-іл)-оцтової кислоти на морфо функціональні показники нейронів сенсомоторної зони кори в щурів з внутрішньомозковим крововиливом / В.В. Галиця // *Вісн. Запоріз. нац. ун-ту.* – 2008. – № 2. – С. 28-33.
8. Julio Cesar G. R. *Acute ischemic stroke* / G. R. Julio Cesar. – Publisher InTech, 2012. – 236 p.
9. Marianna Muranyi. *Streptozotocin-induced diabetes causes astrocyte death after ischemia and reperfusion injury* / Muranyi Marianna, Ding Chaonan, He QingPing [et al.] // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55. – P. 349-355.
10. Jing Li . *Temporal profile of astrocytes and changes of oligodendrocyte-based myelin following middle cerebral artery occlusion in diabetic and non-diabetic rats* / Li Jing, Qingping He, Jian-Zhong Zhang [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2013. – № 9 (2). – P.190–199.
11. 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.
12. 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.
13. Kolesnik Y.M. *Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement* / Y.M. Kolesnik, A.V. Abramov // *Microscopy and Analysis.* – 2002. – № 5. – P. 12-16.

МОДИФИЦІРУЮЩЕ ВЛІВАННЯ САХАРНОГО ДІАБЕТА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ЛОБНОЇ ДОЛІ КОРИ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС-САМЦОВ С ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ

Резюме. За результатами експериментального дослідження встановлено, що ішемія-реперфузія знижує щільність нервових і підвищує щільність апоптичних кліток в корі лобної доли головного мозку в обидва строки спостереження і знижує щільність гліальних кліток на 12-е доби. При ішемічно-реперфузійному пошкодженні виникає збільшення площі нейронів і апоптично змінених кліток в ранньому постішемічному періоді. На 12-е доби після моделювання каротидної ішемії-реперфузії зменшується площа нервових і гліальних кліток і збільшується – апоптичних. Виявлено, що у тварин з стрептозотоксин-індукованим діабетом

зменшується сумарна щільність і процентне співвідношення нервових і гліальних кліток лобної доли кори великих півкуль і збільшується в апоптичних. Доведено, що площа нервових кліток зростає в тварин з цукровим діабетом і в пізньому ішемічно-реперфузійному періоді і зменшується в ранньому періоді. В ранньому ішемічно-реперфузійному періоді тварин з цукровим діабетом зменшується коефіцієнт форми і елонгації апоптичних кліток, а в пізньому періоді тварин з діабетом дані коефіцієнти збільшуються в нервових клітках.

Ключові слова: головний мозок, ішемія-реперфузія, цукровий діабет, нейрони, глія, апоптоз.

MODIFYING EFFECT OF DIABETES ON SENSITIVITY OF THE CEREBRAL FRONTAL LOBE CELLS OF MALE RATS TO ISCHEMIC - REPERFUSION INJURY

Abstract. Ischemia - reperfusion reduces the density of neurons and increases the density of apoptotic cells in the cortex of the cerebral frontal lobe in both periods of observation and reduces the density of glial cells on the 12th day, according to results of the pilot study. Increase of the area of neurons and apoptotic cells occurs in early postischemic period in case of ischemic-reperfusion injury. The area of neurons and glial cells decreases and the area of apoptotic cells increases on the 12th day after the simulation of carotid ischemia reperfusion. The total density and the percentage ratio of nervous and glial cells of the frontal

lobe of the cerebral cortex decline in animals with streptozotocin – induced diabetes meantime it increases in apoptotic cells. The area of the nervous cells increases in groups of animals with diabetes and ischemic-reperfusion in the late period, and decreases in the early period. Form coefficient and elongation of apoptotic cells decreases in rats with diabetes in early ischemic-reperfusion period, meantime those factors increase in nervous cells in the late period.

Key words: brain, carotid ischemia-reperfusion, neurons, glia, apoptosis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 07.10.2013 р.
Рецензент – проф. Пашковська Н.В. (Чернівці)