

УДК 616.831-005.4-018.82:616.379-008.64

**Т.І. Кметь**

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

## МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА P53+ НЕРВОВИХ ТА ГЛІАЛЬНИХ КЛІТИН РІЗНИХ ЧАСТОК ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ, УСКЛАДНЕНОМУ ІШЕМІЧНО- РЕПЕРFUЗІЙНИМ ПОШКОДЖЕННЯМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

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

**Резюме.** В експериментальних дослідженнях на білих щурах-самцях із тримісячним цукровим діабетом вивчено в динаміці вплив ішемії-реперфузії головного мозку на морфометричні показники p53+ нервових та гліальних клітин різних часток кори великих півкуль. Встановлено, що двобічна каротидна ішемія-реперфузія зумовлює найбільш виражений дисбаланс морфометричних показників білка p53+ - нейроцитів кори лобової частки півкуль головного мозку в ранньому постішемічному періоді та p53+-нервових і гліальних клітин кори тім'яної частки у віддаленому терміні ішемії-реперфузії. У лабораторних тварин зі стрептозотин-індукованим цукровим діабетом спостерігається зростання площі, коефіцієнтів форми та елонгації p53+-нейроцитів кори тім'яної частки півкуль головного мозку. Доведено, що цукровий діабет спричиняє зниження коефіцієнтів форми та елонгації p53+-нервових клітин неокортекса тім'яної частки півкуль за умов ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку в обидва терміни спостереження.

### Вступ

Ішемічне ураження мозку є важливою медико-соціальною проблемою, оскільки в більшості країн світу дана патологія посідає чільне місце в структурі загальної смертності населення [1, 2], особливо серед осіб працездатного віку. Ішемічні пошкодження головного мозку можуть бути наслідком не лише судинної патології внутрішніх органів, але й системних порушень метаболізму [5], до яких належить цукровий діабет (ЦД) [8]. Останніми роками значна увага науковців прикута до вивчення білка, що експресується геномом p53, який відповідає за програмовану клітинну смерть у різних органах та систем [12]. Зміни в синтезі цього протеїну на фоні ішемії-реперфузії головного мозку [7] та різних порушень метаболізму активно досліджуються [11]. Порушення апоптичної активності в тимусі [13], у корі лобової частки та різних полях гіпокампа самців-щурів за умов комбінованого впливу ішемії та ЦД підтверджені експериментально [4]. Однак відсутні комплексні дослідження, які б одночасно охоплювали основні зміни морфометричних параметрів p53+ нервових та гліальних клітин кори лобової, тім'яної та скроневої часток (КЛЧ, КТЧ та КСЧ) півкуль головного мозку за умов гострого порушення церебрального кровообігу

© Т.І. Кметь, 2015

ішемічного генезу та ЦД, що свідчить про актуальність подібного наукового пошуку.

### Мета дослідження

Дослідити поєднаний вплив двобічної каротидної ішемії-реперфузії головного мозку різної тривалості та ЦД на морфометричні показники p53+ клітин кори різних часток півкуль лабораторних щурів.

### Матеріал і методи

Для моделювання ЦД двомісячним щурам-самцям одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотин (Sigma, Aldrich, США) у дозі 60 мг/кг маси тіла [6]. В експеримент включали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Тривалість діабету - 3 міс. У п'ятимісячних щурів контрольної групи та тих, що мали тримісячний ЦД здійснювали 20-хвилинну оклюзію обох сонних артерій під внутрішньоочеревним наркозом (каліпсол, 75 мг/кг). Після цього кровотік по судинах відновлювали для досягнення реперфузії [3]. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії частину тварин виводили з експерименту через 1 годину по завершенні реперфузійного періоду, а відстрочених - на 12-ту добу.

Евтаназію тварин здійснювали під каліп-

соловим наркозом відповідно до 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.

Мозок виймали на холоді, за координатами стереотаксичного атласу [10] виділяли КЛЧ, КТЧ та КСЧ півкуль і поміщали їх у фіксатор Буена на 24 год. Після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Потім здійснювали депарафінізацію в ксилолі, регідрацію в низхідних концентраціях етанолу та відмивання в 0,1 М фосфатному буфері. Оброблені гістохімічними методами імунофлуоресценції з моноклональними антитілами зрізи вивчали у флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP (Zeiss, Німеччина). Досліджували морфометричні параметри р53+ клітин різних часток півкуль кори головного мозку за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [9].

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

### Обговорення результатів дослідження

За результатами експериментального дослідження встановлено (табл.), що каротидна ішемія з одногодинною реперфузією спричинила зростання коефіцієнта форми р53+ нервових клітин у КЛЧ і КТЧ півкуль головного мозку відповідно на 16 та 7 %, а коефіцієнт елонгації досліджуваного типу клітин у КТЧ підвищився на 5%, однак у КСЧ навпаки, зменшився на 8% стосовно контролю. Вірогідних змін досліджуваних параметрів р53+ гліальних клітин не зафіксовано у жодній із часток півкуль неокортексу. За умов ранньої ішемії-реперфузії спостерігалось вірогідне зниження площі р53+-нервових клітин у КЛЧ півкуль головного мозку на 18 %, тоді як у КСЧ досліджуваній параметр р53+-гліальних клітин навпаки, підвищився на 5 % відносно контролю.

На 12-ту добу спостереження в КЛЧ півкуль головного мозку коефіцієнти форми та елонгації р53-позитивних нейронів вірогідно збільшилися на 27 та 8 % відповідно щодо контролю і на 9 та 7 % - стосовно раннього терміну ішемії-реперфузії. У КСЧ коефіцієнт форми досліджуваного типу клітин підвищився на 13 %, а коефіцієнт елонгації навпаки, зменшився на 7 % стосовно контрольної групи тварин. У свою чергу, у КТЧ мало місце

достовірне зниження коефіцієнтів форми і елонгації р53+ нервових клітин на 12 % по відношенню до контролю і на 18 та 6 % відповідно до попередньої групи щурів, а в гліальних клітинах дані показники також зменшилися відповідно на 3 та 4%. У даному періоді спостереження у КТЧ півкуль головного мозку відмічалось достовірне зростання площі р53+-гліоцитів на 29% стосовно показника в контрольних щурів і на 26% - стосовно раннього терміну ішемії-реперфузії, а досліджуваний показник нервових клітин підвищився у відповідних термінах у 3,1 раза. Характерно, що в КЛЧ та КСЧ мало місце зростання лише площі р53+ гліальних клітин відповідно на 36 і 32 % по відношенню до контролю і на 27 і 18 % стосовно ранньої постішемії. Імовірно, що зростання площі р53+ клітин, особливо у КТЧ півкуль головного мозку є наслідком їх набряку, що надалі дістало підтвердження при аналізі коефіцієнтів форми та елонгації.

Моделювання ЦД супроводжувалося зростанням площі, коефіцієнтів форми і елонгації р53+ нервових клітин КТЧ відповідно на 17, 6 та 9% по відношенню до контролю, а у КСЧ підвищилися лише коефіцієнт форми р53+ нейронів на 17% і площа р53+ гліоцитів на 5 % стосовно контрольної групи тварин. Слід відмітити, що вірогідних змін з боку морфометричних параметрів р53+ нервових та гліальних клітин КЛЧ півкуль не зафіксовано.

У ранньому терміні ішемічно-реперфузійного пошкодження тварин із ЦД виявлені зміни тільки в КТЧ півкуль нової кори, які характеризувалися зниженням р53-позитивних нервових клітин вище вказаних коефіцієнтів, відповідно на 10 та 6% і зростання площі та коефіцієнту елонгації р53+ гліальних клітин відповідно на 7 і 2% відносно показників у щурів із порушенням вуглеводного обміну.

На 12-ту добу постішемічного періоду в тварин із ЦД спостерігалось зниження коефіцієнту форми р53+ нейронів КТЧ та КСЧ неокортексу відповідно на 29 і 15 % стосовно показників у тварин із діабетом і на 21 і 16% - по відношенню до попереднього терміну дослідження, а коефіцієнт елонгації зменшився у досліджуваному типі клітин КТЧ на 9% відносно показника у щурів із ЦД. У КТЧ півкуль нової кори відмічалось вірогідне зниження площі та коефіцієнту форми р53+ гліальних клітин відповідно на 7 і 2%, а у КСЧ - зменшився лише коефіцієнт форми р53+-гліоцитів на 2% стосовно попереднього терміну спостереження.

Морфометричні параметри білка р53+ нервових та гліальних клітин у корі різних часток великих півкуль щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (на 1 мм<sup>2</sup>) (M±m)

Група спостереження	Нервові клітини			Гліальні клітини		
	Площа, мкм	Коефіцієнт форми	Коефіцієнт елонгації	Площа, мкм <sup>2</sup>	Коефіцієнт форми	Коефіцієнт елонгації
<b>Кора лобової частки</b>						
Контроль	116,03±7,08	0,453±0,016	0,571±0,014	8,90±0,32	0,807±0,007	0,661±0,006
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	94,90±6,86*	0,526±0,016*	0,577±0,014	9,52±0,34	0,814±0,007	0,669±0,006
Ішемія-реперфузія (12 діб)	103,66±7,08	0,574±0,018**	0,618±0,014**	12,07±0,73**	0,793±0,012	0,653±0,010
Діабет	105,65±7,50	0,550±0,022	0,604±0,015	9,06±0,40	0,816±0,008	0,673±0,008
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	103,31±5,99	0,575±0,018	0,616±0,013	9,38±0,32	0,819±0,006	0,676±0,006
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	111,41±14,41	0,534±0,035	0,651±0,023	9,12±0,58	0,794±0,013	0,654±0,012
<b>Кора тім'яної частки</b>						
Контроль	77,88±3,65	0,648±0,013	0,620±0,011	9,36±0,24	0,814±0,005	0,675±0,005
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	76,99±3,30	0,694±0,012*	0,652±0,011*	9,55±0,25	0,821±0,005	0,674±0,005
Ішемія-реперфузія (12 діб)	241,45±18,55**	0,574±0,018**	0,618±0,014*	12,07±0,73**	0,793±0,012**	0,653±0,010**
Діабет	90,79±2,48**	0,684±0,010*	0,672±0,009*	9,96±0,25	0,809±0,004	0,666±0,005
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	92,30±3,92	0,619±0,013#	0,638±0,009#	10,62±0,26#	0,814±0,004	0,679±0,004#
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	92,13±6,62	0,491±0,018**	0,613±0,013#	9,90±0,29*	0,800±0,006*	0,675±0,005
<b>Кора скроневої частки</b>						
Контроль	108,16±10,22	0,500±0,028	0,658±0,017	9,07±0,44	0,806±0,009	0,669±0,008
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	90,08±4,89	0,533±0,013	0,604±0,010*	10,15±0,25**	0,806±0,005	0,669±0,004
Ішемія-реперфузія (12 діб)	102,72±6,89	0,567±0,018*	0,615±0,014*	11,93±0,69**	0,789±0,012	0,649±0,010
Діабет	91,09±4,14	0,584±0,013*	0,620±0,011	10,16±0,26*	0,806±0,005	0,666±0,005
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	89,25±4,02	0,591±0,013	0,617±0,011	9,84±0,26	0,815±0,005	0,670±0,004
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	95,50±5,92	0,497±0,016**	0,619±0,011	9,76±0,25	0,798±0,005*	0,671±0,005

**Примітка:** вірогідність різниці порівняно з: \* - контролем, ^ - ішемію-реперфузією (20 хв / 1 год) у контрольних тварин, # - діабетом, & - ішемію-реперфузією (20 хв / 1 год) у тварин із діабетом

**Висновки**

1. Двобічна каротидна ішемія-реперфузія зумовлює найбільш виражений дисбаланс морфометричних параметрів проапоптичного білка p53+ нейрокитів кори лобової частки півкуль головного мозку в ранньому постішемичному періоді та p53+ нервових та гліальних клітин кори тім'яної частки у віддаленому терміні ішемії-реперфузії.

2. У тварин із тримісячним цукровим діабетом спостерігається зростання площі, коефіцієнтів форми та елонгації p53+ нейрокитів кори тім'яної частки півкуль головного мозку.

3. Цукровий діабет спричиняє зниження коефіцієнтів форми та елонгації p53+ нервових клітин неокортексу тім'яної частки півкуль на ішемично-реперфузійне пошкодження головного мозку в обидва терміни спостереження.

**Перспективи подальших досліджень**

Оцінка результатів даного дослідження свідчить про доцільність вивчення впливу двобічної каротидної ішемії-реперфузії у поєднанні з експериментальним цукровим діабетом на експресію антиапоптичного білка Bcl-2 в нервових та гліальних клітин різних часток великих півкуль головного мозку.

**Література.** 1. Зозуля Ю.П. Проблеми судинно-церебральної патології та шляхи їх вирішення / Ю.П. Зозуля, Т.С. Міщенко // Ж. НАМН України. - 2011. - Т. 17, № 1. - С. 19-25. 2. Міщенко Т.С. Проблема патології нервової системи в Україні та стан вітчизняної неврологічної служби на межі десятиріччя / Т.С. Міщенко // Здоров'я України. - 2010. - Т. 3, № 14. - С. 3-4. 3. 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. 4. Ткачук С.С. Экспресія білків Hif-1 $\alpha$ , p53 та Bcl-2 в головному мозку за умов двобічної каротидної ішемії-реперфузії на тлі цукрового діабету в самців-щурів / С.С. Ткачук, О.М. Ленков // Клінічна та експериментальна патологія. - 2010. - Т. IX, № 2(32). - С. 111-113. 5. Ballantyne C.M. Adolescent type 1 Diabetes cardio-renal Intervention Trial (AdDIT) / C.M. Ballantyne // BMC Pediatr. - 2009. - Vol. 9 - P. 79-86. 6. 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. 7. Hong Li-Zni. p53-mediated neuronal cell in ischemic brain injury / Li-Zni Hong, Xiao-Yuan Zhao, Hui-Ling Zhang // Neurosci. Bull. - 2010. - Vol. 26, № 3. - P. 232-240. 8. Idris I. Diabetes mellitus and stroke / I. Idris, G. A. Thomson, J. C. Sharma // Int. J. Clin. Pract. - 2006. - V. 60, № 1. - P. 48-56. 9. Kolesnik Y.M. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement / Y.M. Kolesnik, A.V. Abramov // Microscopy and Analysis. - 2002. - № 5. - P. 12-16. 10. Konig J.F. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem / J.F. Konig, P.A. Klippel. - Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1963. - 162 p. 11. Liao J. Delayed treatment with NSC23766 in streptozotocin-induced diabetic rats ameliorates post-ischemic neuronal apoptosis through suppression of mitochondrial p53 translocation // J. Liao, Z. Ye, G. Huang [et al.] // Neuropharmacology. - 2014. - V. 85. - P. 508-516. 12. Peng J. Hyperglycemia, p53, and mitochondrial pathway of apoptosis are involved in the susceptibility of diabetic models to ischemic acute kidney injury / J. Peng, X. Li, D. Zhang [et al.] // Kidney Int. - 2015. - V. 87, № 1. - P.

137-150. 13. Tkachuk O.V. Effect of streptozotocin-induced diabetes and transient global brain ischemia on apoptosis in the thymus of rats / O.V. Tkachuk // Fiziol. Zh. - 2011. - V. 57, № 6. - P. 58-64.

**МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА P53+ НЕРВНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАЗНЫХ ДОЛЕЙ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА, ОСЛОЖНЕННЫМ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ МОЗГА**

*Т.И. Кметь*

**Резюме.** В экспериментальных исследованиях на белых крысах-самцах с трехмесячным сахарным диабетом изучено в динамике влияние каротидной ишемии-реперфузии головного мозга на морфометрические показатели p53+ нервных и глиальных клеток разных долей больших полушарий. Установлено, что двухсторонняя каротидная ишемия-реперфузия вызывает наиболее выраженный дисбаланс морфометрических параметров проапоптического белка p53+ нейронов коры лобной доли полушарий головного мозга в раннем постисшемическом периоде и p53+ нервных и глиальных клеток коры теменной доли в отдаленном сроке ишемии-реперфузии. В лабораторных животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом наблюдается рост площади, коэффициентов формы и элонгации p53+ нейронов коры теменной доли полушарий головного мозга. Доказано, что сахарный диабет приводит к снижению коэффициентов формы и элонгации p53+ нервных клеток неокортекса теменной доли полушарий на ишемически-реперфузионное повреждение головного мозга в оба сроки наблюдения.

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

**MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF P53+ NERVE AND GLIA CELLS OF DIFFERENT CEREBRAL HEMISPHERE LOBES IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS COMPLICATED BY ISCHEMIC-REPERFUSION INJURIES OF THE BRAIN**

*T.I. Kmet*

**Abstract.** In experimental investigations on albino male rats with three-month diabetes mellitus the influence of carotid ischemia-reperfusion of the brain upon morphometric indices of p53+ nerve and glia cells of different lobes of cerebral hemispheres has been studied in dynamics. Bilateral carotid ischemia-reperfusion has been found to stipulate the most prominent imbalance of morphometric parameters of pro-apoptotic protein of p53+ nerve cells of the frontal lobe of the brain in early post-ischemic period and p53+ nerve and glia cells of the parietal cortex in a remote term of ischemia-reperfusion. Increase of the square, coefficients of the shape and elongation of p53+ nerve cells of the parietal lobe of the cerebral hemispheres is seen in laboratory animals with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Diabetes mellitus is proved to cause decrease of the coefficients of the shape and elongation of p53+ nerve cells of the neocortex of the parietal cerebral lobe to ischemic-reperfusion injury of the brain in both terms of observation.

**Key words:** diabetes mellitus, ischemia-reperfusion of the brain, apoptosis.

**Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi**

*Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, № 4 (54). - P. 46-49.*

*Надійшла до редакції 10.11.2015  
Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький*

*© Т.И. Кметь, 2015*