

Т.М.Бойчук  
Т.І.Кметь  
О.Г.Кметь

ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет»  
Чернівці

**Ключові слова:** цукровий діабет, каротидна ішемія-реперфузія, Bcl-2<sup>+</sup>-нейроцити та гліоцити.

Надійшла: 26.08.2016

Прийнята: 14.09.2016

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2016.3.63-66>

УДК 616.831.312-005.4-018:577.112]:616.379-008.64-092.9

## МОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ BCL-2<sup>+</sup>-КЛІТИН КОРИ ТІМ'ЯНОЇ ЧАСТКИ, ІНДУКОВАНІ НЕПОВНОЮ ГЛОБАЛЬНОЮ ІШЕМІЄЮ-РЕПЕРФУЗІЄЮ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В САМЦІВ-ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

**Реферат.** Досліджено динаміку реакції морфометричних параметрів Bcl-2<sup>+</sup>-нейронів та гліальних клітин кори тім'яної частки на неповну глобальну ішемію-реперфузію в щурів без цукрового діабету та з наявністю останнього. Показано, що у тварин без цукрового діабету 20-хвилинна двобічна каротидна ішемія з односторонньою реперфузією модифікує коефіцієнт форми та елонгації Bcl-2<sup>+</sup>-нейроцитів і коефіцієнт форми гліоцитів. На 12-ту добу спостереження зазначені зміни Bcl-2<sup>+</sup>-нейроцитів та гліоцитів зберігаються та доповнюються змінами площі даних клітин. У тварин із цукровим діабетом в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді знижується площа Bcl-2<sup>+</sup>-нейронів кори тім'яної частки, а на 12-ту добу змін зазнають усі досліджені морфометричні параметри нервових клітин. В обидва терміни спостереження змін морфометричних параметрів гліоцитів не виявлено.

**Morphologia.** – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 63-66.

© Т.М.Бойчук, Т.І.Кметь, О.Г.Кметь, 2016

✉ [kmet.taras@bsmu.edu.ua](mailto:kmet.taras@bsmu.edu.ua)

Boychuk T.M., Kmet T.I., Kmet O.G. Morphometric changes in Bcl-2<sup>+</sup>-cells of the parietal lobe cortex induced by incomplete global cerebral ischemia-reperfusion in male rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus.

**ABSTRACT. Background.** Trigger mechanisms causing death of the nerve and glial cells in the cerebral cortex by means of apoptosis under conditions of diabetes mellitus and ischemia-reperfusion are energy deficiency, ion imbalance etc. Although, certain protective mechanisms resist them, including apoptosis and antiapoptotic Bcl-2 protein in particular. **Objec-**

**tive of the study is to find the peculiarities of morphometric changes in Bcl-2 nerve and glial cells of the parietal lobe of cerebral cortex in during incomplete global ischemia-reperfusion in male rats with experimental diabetes. Methods.** The nerve and glial cells of the parietal lobe of cerebral cortex positive for Bcl-2 protein were identified by means of immunofluorescent method with the videocamera COHU-4722. In the obtained images the computer system of digital analysis VIDAS-386 determined morphometric parameters of Bcl-2<sup>+</sup> cells, in particular: their square surface, coefficients of the shape and elongation. **Results and conclusion.** The results of the experimental study indicated the fact that in animals without diabetes mellitus 20-minute bilateral carotid ischemia with 1 hour reperfusion modifies the coefficient of the shape and elongation of Bcl-2<sup>+</sup> nerve cells and the coefficient of the shape of glial cells. On the 12<sup>th</sup> day of the study the indicated changes of Bcl-2<sup>+</sup> nerve and glial cells remains and are supplemented with changes in the square surface of the given cells. In animals with diabetes mellitus the square surface of Bcl-2<sup>+</sup> nerve cells of the parietal lobe of cerebral cortex decreases in the early ischemic-reperfusion period, and on the 12<sup>th</sup> day changes are found in all the examined morphometric parameters of the nerve cells. In both periods of the study changes of the morphometric parameters in glial cells are not found.

**Key words:** diabetes mellitus, carotid ischemia-reperfusion, Bcl-2<sup>+</sup> nerve and glial cells.

### Citation:

Boychuk TM, Kmet TI, Kmet OG. [Morphometric changes in Bcl-2<sup>+</sup>-cells of the parietal lobe cortex induced by incomplete global cerebral ischemia-reperfusion in male rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus]. *Morphologia*. 2016;10(3):63-6. Ukrainian.

### Вступ

Останні роки характеризуються неухильним зростанням кількості хворих на цукровий діабет (ЦД). За даними IDF (International Diabetes Federation) на планеті налічується понад 350 млн. людей, хворих на дану недугу [1]. Крім цього, ще

у 280 млн виявлено порушення вуглеводного обміну (порушена толерантність до глюкози), при цьому не враховуються ті пацієнти, які не знають про наявність у них діабету, а їх кількість в 3-4 рази перевищує число тих, кому діагноз вже встановлений. Стрімке збільшення випадків

захворюваності на ЦД, відповідно, супроводжується і зростанням смертності [2]. Наявність цього захворювання в декілька разів підвищує ймовірність виникнення гострих порушень мозкового кровообігу, зокрема, ішемічного інсульту, а комбінація цих нозологічних форм зумовлює більш тяжкий їх перебіг [3-5]. До пускових механізмів, які зумовлюють клітинну смерть шляхом апоптозу в умовах діабету та ішемії-реперфузії відносять дефіцит енергії, іоний дисбаланс та кумуляцію внутрішньоклітинної фракції кальцію [6]. Однак їм протидіють захисні механізми, до яких належать регулятори апоптозу, зокрема антиапоптичний білок Bcl-2 [7].

На сьогодні вивчена морфометрична характеристика нервових та гліальних клітин кори тім'яної частки (КТЧ) великих півкуль у щурів-самців із ЦД у різні періоди ішемічно-реперфузійного пошкодження мозку [8]. Проте залишається нез'ясованою динаміка змін морфометричних параметрів Bcl-2<sup>+</sup>-нейро- та гліоцитів КТЧ півкуль головного мозку за умов комбінованого впливу ішемії-реперфузії та ЦД.

**Мета дослідження** – з'ясувати особливості морфометричних змін Bcl-2<sup>+</sup> нервових і гліальних клітин кори тім'яної частки півкуль головного мозку в динаміці перебігу неповної глобальної ішемії-реперфузії в самців-щурів з експериментальним ЦД.

#### **Матеріали та методи**

Експериментальні дослідження проведені на 66 нелінійних білих самцях щурів. Усіх тварин поділено на 6 груп: контрольні тварини; щури, котрим здійснювали 20-хвилинну двобічну каротину ішемію з одноденною реперфузією; тварини, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-ти хвилинної ішемії; щури з ЦД; тварини зі стрептозотиніндукованим діабетом, яким проводили 20-ти хвилинне кліпсування загальних сонних артерій з одноденною реперфузією; щури з порушенням вуглеводного обміну, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної каротидної ішемії.

ЦД моделювали одноразовим внутрішньочеревним введенням стрептозотину («Sigma», Aldrich, США) двомісячним тваринам у дозі 60 мг/кг маси тіла [9]. По досягненні 5 міс у частини тварин контрольної групи, а також із діабетом під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг) здійснювали двобічне перетискання загальних сонних артерій упродовж 20-ти хв [10]. Одну групу тварин виводили з експерименту через 1 год., іншу – на 12-ту добу постішемічного періоду декапітацією під каліпсоловим наркозом.

Утримання та маніпуляції над тваринами проводилися з дотриманням норм національного та міжнародного законодавства згідно із положеннями «Загальні етичні принципи проведення

експериментів над тваринами» (Київ, 2001); вигодами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.).

Негайно на холоді виймали мозок і за координатами стереотаксичного атласу [11] виділяли КТЧ півкуль головного мозку та поміщали у фіксатор Буена на 24 год. Після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм.

Bcl-2<sup>+</sup> клітини КТЧ ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP («Zeiss», Німеччина) та відеокамери COHU-4722 («COHU Inc.», США). В отриманих зображеннях у комп'ютерній системі цифрового аналізу VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Німеччина) аналізували морфометричні параметри Bcl-2<sup>+</sup> клітин, а саме: їх площу, коефіцієнти форми та елонгації.

Цифрові результати досліджень опрацьовані в прикладних програмах «Statistica 6.0» та «SPSS 13» із використанням критерію t Стьюдента для незалежних вибірок. Результати подано у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

#### **Результати та їх обговорення**

За результатами експериментального дослідження встановлено (табл. 1), що після 20-хвилинної каротидної ішемії з одноденною реперфузією площа Bcl-2<sup>+</sup> нервових та гліальних клітин КТЧ півкуль головного мозку залишалася незмінною. Проте на 12-ту добу спостереження досліджуваній параметр Bcl-2<sup>+</sup>-гліоцитів зменшився на 10 %, а Bcl-2<sup>+</sup>-нейроцитів, навпаки, зріс на 25 % щодо контролю і на 26 % – стосовно раннього терміну ішемії-реперфузії.

Після 20-хвилинної каротидної ішемії з одноденною реперфузією в щурів без ЦД мало місце достовірне зменшення коефіцієнтів форми та елонгації Bcl-2<sup>+</sup>-нейроцитів КТЧ відповідно на 8 % і 9 % та достовірне підвищення коефіцієнту форми Bcl-2<sup>+</sup>-гліоцитів на 3 % відносно контролю.

На 12-ту добу спостереження в КТЧ півкуль головного мозку коефіцієнти форми та елонгації Bcl-2-позитивних нейронів залишалися зменшеними на 11 та 10 % відповідно, а досліджувані параметри гліоцитів, навпаки, зросли на 5 % стосовно відповідних показників контрольної групи тварин.

Тримісячний ЦД не вплинув на площу Bcl-2<sup>+</sup> нервових та гліальних клітин досліджуваної частки кори, однак у тварин цієї експериментальної групи виявлено достовірне зростання коефіцієнту форми Bcl-2<sup>+</sup>-нейро- та гліоцитів відповідно на 3 і 2 % відносно контролю.

Морфометричні параметри Vcl-2<sup>+</sup>-клітин кори тім'яної частки великих півкуль щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m); (n=11)

| Група спостереження                       | Площа, мкм <sup>2</sup>     | Коефіцієнт форми              | Коефіцієнт елонгації     |
|---|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>Нервові клітини</b>                    |                             |                               |                          |
| Контроль                                  | 41,06±2,27                  | 0,777±0,012                   | 0,679±0,014              |
| Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)           | 40,49±3,21                  | 0,716±0,018*                  | 0,619±0,020*             |
| Ішемія-реперфузія (12 діб)                | 51,12±3,16 <sup>^</sup>     | 0,693±0,030*                  | 0,615±0,030*             |
| Діабет                                    | 46,20±1,96                  | 0,802±0,005*                  | 0,708±0,011              |
| Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год) | 35,87±1,40 <sup>#</sup>     | 0,793±0,010                   | 0,685±0,011              |
| Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)      | 43,64±3,51 <sup>&amp;</sup> | 0,755±0,016 <sup>#&amp;</sup> | 0,647±0,020 <sup>#</sup> |
| <b>Гліальні клітини</b>                   |                             |                               |                          |
| Контроль                                  | 10,17±0,35                  | 0,845±0,007                   | 0,697±0,009              |
| Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)           | 9,61±0,38                   | 0,873±0,006*                  | 0,719±0,009              |
| Ішемія-реперфузія (12 діб)                | 9,15±0,33*                  | 0,888±0,010*                  | 0,729±0,013*             |
| Діабет                                    | 9,61±0,32                   | 0,864±0,005*                  | 0,702±0,009              |
| Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год) | 9,54±0,25                   | 0,869±0,004                   | 0,702±0,006              |
| Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)      | 10,2±0,53                   | 0,871±0,008                   | 0,698±0,013              |

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.

У ранньому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження мозку у тварин із ЦД виявлено зниження площі Vcl-2<sup>+</sup> нервових клітин на 23 % стосовно показника у щурів із порушенням вуглеводного обміну. Решта показників морфометричного стану Vcl-2<sup>+</sup> нервових та гліальних клітин залишалися без змін.

На 12-ту добу постішемічного періоду у щурів-самців із ЦД спостерігалось підвищення площі Vcl-2<sup>+</sup>-нервових клітин на 22 % стосовно попереднього терміну, внаслідок чого даний показник практично наблизився до такого в щурів із діабетом без порушення церебрального кровообігу. Крім того, в цей період спостереження виявлено достовірне зниження коефіцієнта форми Vcl-2<sup>+</sup>-нейронів КТЧ на 6 % стосовно показника у тварин із ЦД і на 5 % – відносно попереднього терміну спостереження, а також коефіцієнта елонгації – на 9 % відносно показника в щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом. Слід відмітити, що дані параметри Vcl-2<sup>+</sup>-гліоцитів у тварин цієї експериментальної групи змін не знали.

#### Висновки

1. У тварин без цукрового діабету 20-хвилинна двобічна каротидна ішемія з одноденною реперфузією модифікує коефіцієнт форми та елонгації Vcl-2<sup>+</sup>-нейроцитів і коефіцієнт форми гліоцитів. На 12-ту добу спостереження зазначені зміни Vcl-2<sup>+</sup>-нейроцитів та гліоцитів зберігаються та доповнюються змінами площі даних клітин.

2. У тварин із цукровим діабетом в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді знижується площа Vcl-2<sup>+</sup>-нейронів кори тім'яної частки півкуль головного мозку, а на 12-ту добу змін зазнають усі досліджені морфометричні параметри нервових клітин. В обидва терміни спостереження змін морфометричних параметрів гліоцитів не виявлено.

#### Перспективи подальших розробок

Оцінка результатів свідчить про доцільність вивчення продуктів експресії інших генів, що реагують на системні зміни метаболізму та ішемію.

#### Літературні джерела References

1. IDF Diabetes Atlas. 5-th edition. 2012. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/>
2. Asfandiyarova NS. [A review of mortality in type 2 diabetes mellitus]. *Diabetes Mellitus*. 2015;18(4):12-21. doi 10.14341/DM6846. Russian.
3. Hayashi T, Kawashima S, Nomura H, Itoh H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Sone H, Hattori

- Y, Yoshizumi M, Ina K, Kubota K. Age, gender, insulin and blood glucose control status alter the risk of ischemic heart disease and stroke among elderly diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:86-9. doi:10.1186/1475-2840-10-86.

4. Sui X, Lavie CJ, Hooker SP, Lee DC, Colabianchi N, Lee CD, Blair SN. A prospective

study of fasting plasma glucose and risk of stroke in asymptomatic men. *Mayo Clin Proc.* 2011 Nov;86(11):1042-9. doi: 10.4065/mcp.2011.0267.

5. Arboix A, Rivas A, Garcia-Eroles L, de Marcos L, Massons J, Oliveres M. Cerebral infarction in diabetes: Clinical pattern, stroke subtypes, and predictors of in-hospital mortality. *BMC Neurol.* 2005;5(1):5-9.

6. Shanmuga Sundaram R, Gowtham L, Ayak BS. The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2012;5(2):1-7.

7. Hughes P, Bouillet P, Strasser A. Role of Bim and other Bcl-2 family members in autoimmune and degenerative diseases. *Curr Dir Autoimmun.* 2006;9:74-94.

8. Kmet TI. [Dynamics of the neurons and glial

cells reaction of the cerebral cortex parietal lobe on ischemic reperfusion injury in rats with diabetes mellitus]. *Buk Med Herald.* 2016;20(1):45-9. Ukrainian.

9. Bassirat M, Khalil Z. Short- and long-term modulation of microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats by glycosylated products. *J Diabetes Complications.* 2010 Jan-Feb;24(1):64-72. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2008.10.001.

10. Skibo GG. [The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions]. *Pathologia.* 2004;1(1):22-30. Russian.

11. Konig 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.

**Бойчук Т.Н., Кметь Т.И., Кметь О.И. Морфометрические изменения  $\text{bcl-2}^+$  клеток коры теменной доли, индуцированные неполной глобальной ишемией-реперфузией головного мозга у самцов-крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом.**

**Реферат.** Исследована динамика реакции морфометрических параметров  $\text{Bcl-2}^+$ -нейронов и глиальных клеток коры теменной доли на неполную глобальную ишемию-реперфузию у крыс без сахарного диабета и с наличием последнего. Показано, что у животных без сахарного диабета 20-минутная двусторонняя каротидная ишемия с одночасовой реперфузией модифицирует коэффициент формы и элонгации  $\text{Bcl-2}^+$ -нейроцитов и коэффициент формы глиоцитов. На 12-е сутки наблюдения указанные изменения  $\text{Bcl-2}^+$ -нейроцитов и глиоцитов сохраняются и дополняются изменениями площади данных клеток.

У животных с сахарным диабетом в раннем ишемически-реперфузионном периоде снижается площадь  $\text{Bcl-2}^+$ -нейронов коры теменной доли, а на 12-е сутки изменения претерпевают все исследованные морфометрические параметры нервных клеток. В оба срока наблюдения изменений морфометрических параметров глиоцитов не обнаружено.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, каротидная ишемия-реперфузия,  $\text{Bcl-2}^+$ -нейроциты и глиоциты.