

Abstract

T. I. Kmet',

O. G. Kmet',

*Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University",
2 Teatralna Sq, 58002 Chernivtsi,
Ukraine*

EARLY AND DELAYED REACTION OF HIF-1 α PROTEIN FOR BILATERAL CAROTID ISCHEMIA-REPERFUSION IN DIFFERENT LOBES OF RAT NEOCORTEX WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Introduction. During the last decade a progressing growth of patients with diabetes mellitus has been marked. Ischemic stroke occupies one of the leading places by the occurrence of complications and mortality of patients with diabetes. The hypoxic-transcription factor HIF-1 α is an important promoter to form the mechanisms of resistance to oxygen-substrate deficiency in the cerebral cortex.

Purpose. The objective of the study is to find the peculiarities of HIF-1 α protein reaction to incomplete global cerebral ischemia with reperfusion of various durations in separate lobes of the cerebral neocortex in male rats with experimental diabetes mellitus and to make their comparative analysis.

Materials and Methods. Streptozotocin was injected to two-month male rats to simulate diabetes mellitus. In a part of the animals general carotid arteries were clipped bilaterally at the age of 5 month for 20 minutes, after that blood flow was renewed to achieve reperfusion. To study early results of ischemia-reperfusion a part of the animals were deactivated from the experiment 1 hour after reperfusion period was over, for the delayed results – on the 12th day. According to the coordinates of the stereotaxic atlas the cortex of the frontal, parietal and temporal cerebral lobes was isolated. With the aim to identify cells expressing HIF-1 α protein indirect immunofluorescent method was used.

Discussion. The results of the experimental study were indicative of the fact that diabetes mellitus modifies the reaction of antihypoxic HIF-1 α protein in early ischemic-reperfusion period in the cortex of the frontal and parietal lobes, and on the 12th day of the experiment – in all the lobes of the cortex examined.

Key words: diabetes mellitus, carotid ischemia-reperfusion, HIF-1 α protein.

Corresponding author: kmet.taras@bsmu.edu.ua

Резюме

Т. І. Кметь,

О. Г. Кметь,

*ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет»,
Театральна площа, 2,
м. Чернівці, Україна, 58002*

РАННЯ ТА ВІДСТРОЧЕНА РЕАКЦІЯ БІЛКА HIF-1 α НА ДВОБІЧНУ КАРОТИДНУ ІШЕМІЮ-РЕПЕРФУЗІЮ В РІЗНИХ ЧАСТКАХ НЕОКОРТЕКСА ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Досліджено динаміку показників, що характеризують реакцію білка HIF-1 α на неповну глобальну ішемію-реперфузію головного мозку у щурів з експериментальним цукровим діабетом. Встановлено, що цукровий діабет модифікує реакцію цих показників у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді в корі лобової та тім'яної часток, а на 12-ту добу спостереження – в усіх досліджених частках кори.

Ключові слова: цукровий діабет, каротидна ішемія-реперфузія, білок HIF-1 α .

Резюме**Т. І. Кметь,
О. Г. Кметь,***ВГУЗ України «Буковинський
державний медичний
університет», пл. Театраль-
ная, 2, г. Чернівці, Україна,
58002***РАННЯЯ И ОТСРОЧЕННАЯ РЕАКЦИЯ БЕЛКА HIF-1 α
НА ДВУСТОРОННЮЮ КАРОТИДНЮЮ ИШЕМИЮ-
РЕПЕРФУЗИЮ В РАЗНЫХ ДОЛЯХ НЕОКОРТЕКСА КРЫС
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

Исследована динамика показателей, характеризующих реакцию белка Hif-1 α на неполную глобальную ишемию-реперфузию головного мозга у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Установлено, что сахарный диабет модифицирует реакцию данных показателей в раннем ишемически-реперфузионном периоде в коре лобной и теменной долей, а на 12-е сутки наблюдения – во всех исследованных долях коры.

Ключевые слова: сахарный диабет, каротидная ишемия-реперфузия, белок HIF-1 α .

Автор, відповідальний за листування: *kmet.taras@bsmu.edu.ua*

Вступ

Упродовж останнього десятиліття відмічається прогресуюче зростання кількості хворих на цукровий діабет (ЦД). За даними Міжнародної діабетичної федерації (IDF) на сьогодні день на планеті нараховується 382 млн хворих на ЦД, а за прогнозами до 2030 року загальна кількість хворих на цю недугу досягне 592 млн [1]. І хоча упродовж останнього часу намітилися значні успіхи в розумінні патофізіології і молекулярної біології цукрового діабету і його ускладнень, однак на сьогоднішній день це захворювання залишається значущою медичною і соціальною проблемою [2]. Особливу соціальну значущість ЦД визначають його пізні ускладнення. Одне з лідируючих місць за частотою ускладнень і смертності у пацієнтів із діабетом займає патологія центральної нервової системи. За даними літературних джерел [3] ризик розвитку ішемічних інсультів при ЦД зростає у 3–4 рази, а смертність від цереброваскулярних захворювань у 2–3 рази перевищує аналогічні показники в загальній популяції.

Відомо, що одним із найбільш важливих чинників формування механізмів стійкості до киснево-субстратного дефіциту в корі головного мозку є гіпоксично-транскрипційний фактор HIF-1 α [4, 5]. Особливості раннього реагування білка HIF-1 α в корі лобової частки та різних полях гіпокампа щурів-самців із ЦД на ішемію-реперфузію підтверджені експериментально [6]. Вивчено реакцію чутливості нейронів та гліоцитів кори лобової, тім'яної та скроневої часток півкуль головного мозку (КЛЧ, КТЧ та КСЧ відповідно) щурів зі стрептозотозин-

індукованим діабетом до неповної глобальної ішемії-реперфузії за активністю процесів апоптозу [7]. Проте відсутні комплексні дослідження, які б дозволили здійснити порівняльний аналіз умісту білка HIF-1 α в КЛЧ, КТЧ, КСЧ півкуль головного мозку в динаміці порушення церебрального кровообігу ішемічного генезу на тлі ЦД як критерію чутливості цих відділів неокортексу до ішемічно-реперфузійних ушкоджень.

Мета роботи – з'ясувати особливості реагування білка HIF-1 α на неповну глобальну ішемію головного мозку з реперфузією різної тривалості в окремих частках півкуль нової кори самців-щурів з експериментальним цукровим діабетом та здійснити їх порівняльний аналіз.

Матеріали і методи. У дослідженні використано 66 білих нелінійних щурів-самців таких експериментальних груп: 1) контрольні тварини; 2) щури, яким моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію з одногодинною реперфузією; 3) щури, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії; 4) щури з тримісячним ЦД; 5) щури з діабетом, яким моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію з одногодинною реперфузією; 6) щури з ЦД, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії.

Для моделювання ЦД двомісячним щурам-самцям однократно внутрішньоочеревинно вводили стрептозотозин (Sigma, Aldrich, США) дозою 60 мг/кг маси тіла [8]. По досягненні 5-місячного віку в частини тварин здійснювали



двобічне кліпсування загальних сонних артерій упродовж 20 хв., після чого відновлювали кровотік для досягнення реперфузії [9]. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії частину тварин виводили з експерименту через 1 годину після закінчення реперфузійного періоду, а відстрочених – на 12-ту добу.

Експериментальні втручання виконували згідно з основними положеннями GLP (1981 р.), Конвенції ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують для експериментів та інших наукових цілей, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Модельовання ішемії-реперфузії та евтаназію тварин здійснювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг) шляхом декапітації. Миттєво на холоді виймали головний мозок і 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 завтовшки 5 мкм. Потім депарафінували в ксилолі, здійснювали регідратацію в розчинах етилового спирту низхідної концентрації етанолу і три рази по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Для ідентифікації клітин, що експресують білок HIF-1 α , застосовували метод непрямой імуофлуоресценції. Для цього регідратовані гістологічні зрізи різних часток кори півкуль мозку поміщали в інкубатор на 18 годин у вологій камері при $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ із первинними мишачими моноклональними антитілами до HIF-1 α щура (mouse IgG1 isotype, Santa Cruz, США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хвилин при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ із вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували кролячі антитіла до повної молекули IgG миші, кон'юговані з флуоресцентною ізотіоціанатом (Santa Cruz, США). Після інкубації зрізи промивали в 0,1 М фосфатному буфері і поміщали в суміш гліцерину та фосфатного буфера в пропорції 9:1 для подальшої люмінесцентної мікроскопії. В отриманих зображеннях аналізували вміст, концентрацію білка HIF-1 α та площу HIF-1 α -ІРМ в комп'ютерній системі цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [11].

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

Обговорення результатів дослідження.

Результати дослідження наведені в таблиці. Встановлено, що каротидна ішемія з односторонньою реперфузією вплинула на концентрацію білка HIF-1 α лише у КТЧ, спричинивши зростання цього показника в 3,3 рази щодо контролю. Однак загальний вміст білка HIF-1 α достовірно підвищився в КЛЧ у 2 рази, а в КТЧ – у 4,7 рази щодо відповідних показників у тварин контрольної групи. У цьому періоді спостереження площа HIF-1 α -ІРМ зросла в КЛЧ, КТЧ та КСЧ відповідно у 2,9, 3,1 та 2,4 рази.

Із літературних даних відомо, що індукований гіпоксією фактор 1 α регулює експресію більш ніж 200 генів, котрі беруть участь у формуванні стійкості до ішемії та гіпоксії [12]. Таким чином, можна думати, що в наших дослідженнях у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді механізми антигіпоксичного захисту найбільш потужні в КТЧ півкуль головного мозку.

Аналіз відстрочених наслідків ішемії-реперфузії показав зростання концентрації білка HIF-1 α в КТЧ і КСЧ у 2,8 та 2,5 рази відповідно щодо показників у щурів контрольної групи, а у КСЧ – ще й у 2 рази щодо показника при ранньому терміні спостереження. Загальний вміст досліджуваного білка в цей термін достовірно зріс у КЛЧ, КТЧ та КСЧ у 7,2, 11,7 та 8,8 рази відповідно порівняно з контролем і у 3,5, 2,5 та 6,3 рази – щодо раннього постішемічного періоду. У цьому терміні спостереження також мало місце зростання площі HIF-1 α -ІРМ в КЛЧ, КТЧ і КСЧ відповідно у 5 разів, 3,4 та 3,6 рази щодо показників контрольної групи тварин, а у скроневій частці – ще й у 1,5 рази щодо ранньої ішемії-реперфузії.

У щурів із тримісячним ЦД концентрація білка HIF-1 α порівняно з контролем зросла лише в КСЧ (майже у 3 рази). У тварин цієї експериментальної групи зросли також вміст білка HIF-1 α та площа HIF-1 α -ІРМ у КЛЧ у 5,4 і 4,4 рази відповідно, а в КСЧ – в 1,8 та 1,9 рази щодо контролю. Характерно, що в КТЧ ЦД даної тривалості не спричинив жодних змін досліджуваних показників.



Таблиця 1 – Динаміка показників, що характеризують реакцію білка HIF-1 α на двобічну каротидну ішемію-реперфузію в корі різних часток великих півкуль щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M \pm m)

Група спостереження	Концентрація білка HIF-1 α	Уміст білка HIF-1 α	Площа HIF-1 α -IPM на 10 000 мкм ²
Кора лобової частки			
Контроль	$3,45 \cdot 10^{-5} \pm 0,60 \cdot 10^{-5}$	$0,021 \pm 0,004$	$16,14 \pm 3,42$
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	$4,05 \cdot 10^{-5} \pm 0,64 \cdot 10^{-5}$	$0,043 \pm 0,005^*$	$47,53 \pm 8,94^*$
Ішемія-реперфузія (12 діб)	$5,05 \cdot 10^{-5} \pm 0,80 \cdot 10^{-5}$	$0,151 \pm 0,027^{*\wedge}$	$80,68 \pm 15,68^*$
Діабет	$4,10 \cdot 10^{-5} \pm 0,67 \cdot 10^{-5}$	$0,113 \pm 0,024^*$	$70,23 \pm 7,56^*$
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	$6,49 \cdot 10^{-5} \pm 0,79 \cdot 10^{-5}\#$	$0,243 \pm 0,033\#$	$202,20 \pm 37,43\#$
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	$4,38 \cdot 10^{-5} \pm 0,53 \cdot 10^{-5}\&$	$0,250 \pm 0,038\#$	$139,10 \pm 22,52\#$
Кора тім'яної частки			
Контроль	$1,32 \cdot 10^{-5} \pm 0,27 \cdot 10^{-5}$	$0,061 \pm 0,012$	$149,71 \pm 22,44$
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	$4,34 \cdot 10^{-5} \pm 0,57 \cdot 10^{-5}\#$	$0,288 \pm 0,061^*$	$460,23 \pm 57,37^*$
Ішемія-реперфузія (12 діб)	$3,67 \cdot 10^{-5} \pm 0,62 \cdot 10^{-5}\#$	$0,711 \pm 0,105^{*\wedge}$	$511,74 \pm 64,88^*$
Діабет	$2,14 \cdot 10^{-5} \pm 0,44 \cdot 10^{-5}$	$0,095 \pm 0,026$	$104,76 \pm 14,72$
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	$4,74 \cdot 10^{-5} \pm 0,61 \cdot 10^{-5}\#$	$0,232 \pm 0,036\#$	$320,39 \pm 40,79\#$
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	$1,89 \cdot 10^{-5} \pm 0,28 \cdot 10^{-5}\&$	$0,305 \pm 0,049\#$	$148,97 \pm 22,78\&$
Кора скроневої частки			
Контроль	$5,07 \cdot 10^{-5} \pm 0,63 \cdot 10^{-5}$	$0,175 \pm 0,033$	$210,21 \pm 32,49$
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	$6,31 \cdot 10^{-5} \pm 0,59 \cdot 10^{-5}$	$0,247 \pm 0,021$	$513,21 \pm 49,37^*$
Ішемія-реперфузія (12 діб)	$12,87 \cdot 10^{-5} \pm 1,26 \cdot 10^{-5}\#$	$1,548 \pm 0,222^{*\wedge}$	$765,73 \pm 83,30^{*\wedge}$
Діабет	$15,09 \cdot 10^{-5} \pm 1,09 \cdot 10^{-5}\#$	$0,323 \pm 0,034^*$	$402,17 \pm 38,87^*$
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	$8,41 \cdot 10^{-5} \pm 0,71 \cdot 10^{-5}\#$	$0,433 \pm 0,051$	$647,74 \pm 58,94\#$
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	$7,84 \cdot 10^{-5} \pm 0,97 \cdot 10^{-5}\#$	$0,905 \pm 0,161\#\&$	$510,39 \pm 69,07$

Примітка. Достовірність різниці порівняно з: * – контролем; \wedge – ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у контрольних тварин; # – діабетом; & – ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у тварин із діабетом

За умов ускладнення ЦД 20-хвилинною ішемією головного мозку з одногодинною реперфузією в КЛЧ і КТЧ спостерігалось зростання концентрації білка HIF-1 α відповідно на 58 та 120 %, а в КСЧ – зменшення цього показника в 1,8 раза щодо відповідних показників за неускладненого діабету. У тварин цієї експериментальної групи виявлено також зростання вмісту білка HIF-1 α в КЛЧ, КТЧ у 2,2 та 2,4 раза відповідно, а площі HIF-1 α -IPM – у 2,9, 3,1 й 1,6 раза щодо досліджуваних параметрів у щурів із діабетом без порушення церебрального кровообігу.

На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду у тварин із ЦД виявлено зниження концентрації білка HIF-1 α у КСЧ півкуль головного мозку в 1,9 раза щодо показника при діабеті. Також можна відмітити зниження цього показника в 1,5 та 2,5 раза в КЛЧ та КТЧ щодо раннього терміну спостереження. Загальний уміст білка HIF-1 α на 12-ту добу спостереження щодо показників при діабеті зріс у 2,2, 3,2, 2,8 раза в КЛЧ, КТЧ та КСЧ відповідно, а у скроневої частці – ще й у 2,1 раза щодо ранньої ішемії-реперфузії та ЦД.



У цьому терміні постішемичного періоду в щурів зазначеної експериментальної групи площа HIF-1 α -ІРМ у КЛЧ достовірно зросла у 2 рази щодо показника у тварин із діабетом та зменшилася в КТЧ у 1,4 рази щодо попереднього терміну.

Висновки

1. У щурів без цукрового діабету найістотніша реакція білка HIF-1 α на неповну глобальну ішемію-реперфузію головного мозку в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді має місце в корі тім'яної частки півкуль головного мозку, а найслабша – в корі скроневої частки. На 12-ту добу спостереження найбільш вагомі зміни досліджених показників відбуваються в неокортексі тім'яної та скроневої часток півкуль.

2. У тварин із тримісячним експериментальним діабетом у корі скроневої частки великих півкуль головного мозку встановлено підвищення концентрації, вмісту білка HIF-1 α та площі HIF-1 α -імунореактивного матеріалу, у корі лобової частки – вмісту білка HIF-1 α та площі HIF-1 α -імунореактивного матеріалу, а в

Таким чином, цукровий діабет модифікує показники, що характеризують реакцію білка HIF-1 α на неповну глобальну ішемію-реперфузію головного мозку як в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді, так і на 12-ту добу.

корі тім'яної частки змін цих показників не виявлено.

3. У корі лобової та тім'яної часток кори великих півкуль щурів із цукровим діабетом у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді зростають усі показники, що характеризують реакцію білка HIF-1 α на неповну глобальну ішемію-реперфузію головного мозку, а в корі скроневої частки знижується концентрація білка HIF-1 α на тлі зростання площі HIF-1 α -імунореактивного матеріалу.

4. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду у тварин із діабетом спостерігаються різноспрямовані зміни концентрації, вмісту білка HIF-1 α та площі HIF-1 α -імунореактивного матеріалу в усіх досліджених частках неокортексу.

References (список літератури)

- American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2015;38(1):1–594.
- Turenkov IN, Voronkov AV, Slietsans AA. [Role of endothelial dysfunction in the development of vascular complications of diabetes]. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2013;2:80–84.
- Mendez JD. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. *Mol. Cell. Biochem*. 2010;341(1-2):33–41.
- Wang L, Deng W, Yuan Q, Yang H. [Exercise preconditioning reduces ischemia reperfusion-induced focal cerebral infarct volume through up-regulating the expression of HIF-1 α]. *Pak J Pharm Sci*. 2015;28(2):791–798.
- Xiyong Fan, Cobi J. Heijnen, Michael A. van der Kooij, Floris Groenendaala, Frank van Bel. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain research reviews*. 2009;62:99–108.
- 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]. *Clin and Exp Pathol*. 2010;9(2):111–113.
- Boychuk TM, Kmet TI. [Peculiarities of the influence of streptozotocine-induced diabetes and incomplete ischemia-reperfusion of the brain on apoptosis of various neocortical lobes of rats]. *Fiziol Zh*. 2016;62(2):72–78.
- Bassirat M, Khalil Z. Short- and long-term modulation of microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats by glycosylated products. *J Diab Compl*. 2008;22(6):371–376.
- Skibo GG. [The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions]. *Patologija*. 2004;1(1):22–30.
- 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.
- Kolesnik YM, Abramov AV. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement. *Microscopy and Analysis*. 2002;5:12–16.



12. Shlyakhto EV, Barantsevitch ER, Shcherbak NS, Galagudza MM. [Molecular mechanisms of development of cerebral tolerance to ischemia. Part 1]. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;6:42–50.

(received 23.08.2016, published online 29.09.2016)

(одержано 23.08.2016, опубліковано 29.09.2016)

