

Т.Н. БОЙЧУК, Т.И. КМЕТЬ

Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

РЕГИОНАРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ КОРЫ БОЛЬШЫХ ПОЛУШАРИЙ КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРFUЗИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Обнаружено, что эндотелиоциты исследованных областей коры больших полушарий характеризуются индивидуальной чувствительностью к ишемии-реперфузии головного мозга. Установлено, что сахарный диабет модифицирует реакцию эндотелиальных клеток исследованных участков коры на неполную глобальную ишемию-реперфузию головного мозга: в коре лобной и теменной областей устраняет ее в раннем ишемически-реперфузионном периоде и ограничивает на 12-е сутки постишемического периода, в коре височной области - изменяет качественный и количественный характер реакции в оба срока наблюдения. Показано, что концентрация РНК в условиях неполной глобальной ишемии-реперфузии головного мозга крыс без диабета повышается в эндотелиальных клетках всех исследованных областей коры больших полушарий в оба срока наблюдения, а у животных с сахарным диабетом – только на 12-е сутки.

Ключевые слова: головной мозг, сахарный диабет, ишемия-реперфузия, эндотелиоциты.

Актуальность. Сахарный диабет (СД) является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины, что обусловлено высокой, постоянно возрастающей распространенностью заболевания, клиническим полиморфизмом, тяжестью осложнений *8+. В Украине официально зарегистрировано более миллиона больных СД, однако реальное количество людей с недиагностированной патологией превышает эту цифру в 3-4 раза. По данным эпидемиологических исследований СД по уровню инвалидизации и смертности занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний *9+. Однако главной причиной смертности у больных СД являются сердечно-сосудистые осложнения *5, 6+, в частности, нарушение мозгового кровообращения *7+. Сегодня нет никаких сомнений в том, что наиболее ранним проявлением поражения сосудов при диабете является эндотелиальная дисфункция, которая присуща также ишемически-реперфузионным поражениям нервной ткани *2+. Поэтому изучение морфологических и функциональных аспектов взаимосвязи этих патологий является важной задачей медицинской науки. Получено достаточно данных о постишемически-реперфузионных и диабетических изменениях в различных структурах головного мозга *1, 3+. Однако данные о ранних и отсроченных последствиях ишемии-реперфузии для показателей морфофункционального состояния эндотелиальных клеток различных участков коры конечного мозга в условиях СД в научной литературе ограничены.

Цель работы. Изучить селективную чувствительность эндотелиоцитов различных функциональных отделов коры головного мозга к неполной глобальной ишемии-реперфузии в условиях стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на шестимесечных самцах белых нелинейных крыс, из которых были сформированы следующие экспериментальные группы: 1. Контрольные крысы; 2. Крысы, которым моделировали 20-минутную двустороннюю каротидную ишемию-реперфузию (ДКИР) с односторонней реперфузией; 3. Крысы, которых выводили из эксперимента на 12-е сутки после моделирования 20-минутной ДКИР; 4. Крысы

с СД; 5. Крысы с СД, которым моделировали 20-минутную ДКИР с односторонней реперфузией; 6. Крысы с СД, которых выводили из эксперимента на 12-е сутки после моделирования 20-минутной ДКИР. СД моделировали однократным внутрибрюшным введением стрептозотоцина (Sigma, Aldrich, США) в дозе 60 мг/кг самцам крыс в возрасте 2 месяца *2+. По достижении шестимесечного возраста у части крыс осуществляли двустороннее клипирование общих сонных артерий в течение 20 мин., после чего восстанавливали кровоток для достижения реперфузии *4+. Для изучения ранних последствий ишемии-реперфузии часть животных выводили из эксперимента через 1 ч, а отсроченных последствий - на 12-е сутки. Моделирование каротидной ишемии и эктаназия животных осуществляли под калипсоловым наркозом (75 мг/кг). Для проведения морфометрических исследований мозг фиксировали в растворе Буэна в течение 24 ч, затем по стандартной схеме проводили гистологическую проводку и ткань заливали в парафин, готовили серийные срезы толщиной 5 мкм. Для изучения морфофункционального состояния эндотелиоцитов коры мозга гистологические срезы депарафинировали и окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления РНК. Изображение коры мозга получали на микроскопе AXIOSKOP (Zeiss, Германия) и с помощью видеокамеры COHU-4722 (COHU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Морфометрический анализ клеток мозга осуществляли в автоматическом режиме с помощью программы VIDAS-2,5 (Kontron Elektronik, Германия). Определили следующие показатели для эндотелиальных клеток: плотность (количество клеток на 1 мм площади среза коры мозга), площадь (мкм²), эквивалентный диаметр (мкм) и концентрация РНК (единицы оптической плотности, E_{opt}). Статистическую значимость различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Данные представлены в виде средних арифметических и стандартного отклонения. Все экспериментальные процедуры осуществлены согласно «Положения об использовании животных биомедицинских исследованиях» и Конвенции Совета Европы об охране

позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях от 18.03.1986 г. **Результаты исследования.** Анализ полученных данных (табл.) свидетельствует, что у контрольных крыс ишемия мозга с одночасовой реперфузией повышает содержание РНК в эндотелиальных клетках лобной и теменной областей коры, уменьшает плотность расположения данных клеток и повышает их площадь в височной и теменной областях. Такое снижение плотности расположения эндотелиоцитов на фоне увеличения площади, скорее всего, является свидетельством отека ткани, развивающийся вследствие ишемически-реперфузионного повреждения. На 12-е сутки наблюдения достоверно возрастала плотность эндотелиоцитов и содержание в них РНК как по отношению к контролю, так и относительно предыдущего срока наблюдения, в коре лобной и височной областей, а площадь возвращалась к норме. Только в коре теменной области плотность расположения эндотелиальных клеток оставалась сниженной по сравнению с контрольными животными. Это наводит на мысль о возможной гибели клеток, хотя эта точка зрения требует морфологических подтверждений. Таким образом, последствия ишемии головного мозга, судя по морфофункциональному состоянию эндотелиоцитов, являются долговременными и не заканчиваются к 12-м суткам ишемически-реперфузионного периода. Кроме того, следует отметить определенные различия в реакции эндотелиальных клеток различных отделов коры на ишемию-реперфузию.

В условиях стрептозотоцин-индуцированного диабета плотность расположения эндотелиоцитов в лобной, теменной и височной областях коры больших полушарий уменьшилась соответственно на 16 %, 18 % и 17 % относительно аналогичных показателей у животных контрольных групп. Такие односторонние изменения могут быть следствием гибели данного типа клеток, что, на наш взгляд, может стать основой формирования эндотелиальной дисфункции. Кроме того, в теменной области коры животных с диабетом выявлен рост эквивалентного диаметра эндотелиоцитов на 6 % по сравнению с контролем. Моделирование стрептозотоцин-индуцированного диабета сопровождалось также ростом концентрации РНК в эндотелиоцитах всех исследованных участков коры больших полушарий в пределах 4-6 % по сравнению с контрольной группой животных.

В раннем ишемически-реперфузионном периоде у животных с диабетом плотность расположения эндотелиоцитов оставалась ниже относительно такого в интактных крыс во всех исследованных отделах коры, но только в коре теменной области она снизилась относительно показателя у крыс с диабетом. Характерно, что только в этом отделе снижением отреагировали также эквивалентный диаметр (на 6 %) и концентрации РНК (на 14 %). Однако, на 12-е сутки плотность эндотелиальных клеток в указанном участке коры

больших полушарий возросла на 23 % по отношению к предыдущему сроку наблюдения, достигнув контрольного уровня. В условиях позднего ишемически-реперфузионного периода у крыс с диабетом наблюдался рост концентрации РНК в эндотелиоцитах теменной, лобной и височной областей коры больших полушарий на 6, 8 и 9 % соответственно относительно показателей у животных с СД без нарушения мозгового кровообращения и на 21, 9, 9 % – по сравнению с предыдущим сроком.

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет констатировать модифицирующие воздействия СД на реакцию эндотелиоцитов исследованных отделов коры больших полушарий на ишемию-реперфузию. Они заключались в отсутствии реакции, присущей контрольным крысам, в раннем сроке нарушения мозгового кровообращения и ее ограничении на 12-е сутки наблюдения изменениями концентрации РНК в коре лобной и теменной областей. Что касается теменной части коры, то реакция ее эндотелиальных клеток по количеству измененных показателей превышала таковую у контрольных крыс и характеризовалась качественными различиями. Возрастание в данных клетках концентрации РНК и увеличение их плотности может рассматриваться как свидетельство активации процессов биосинтеза и эндотелиальной пластичности, направленной на преодоление последствий их повреждения.

Выводы.

1. Эндотелиоциты исследованных областей коры больших полушарий характеризуются индивидуальной чувствительностью к ишемии-реперфузии головного мозга.
2. Сахарный диабет модифицирует реакцию эндотелиальных клеток исследованных отделов коры на неполную глобальную ишемию-реперфузию головного мозга: в коре лобной и теменной областей устраняет ее в раннем ишемически-реперфузионном периоде и ограничивает на 12-е сутки постишемического периода, в коре височной доли – изменяет качественный и количественный характер реакции в оба срока наблюдения.
3. Концентрация РНК в условиях неполной глобальной ишемии-реперфузии головного мозга крыс без диабета повышается в эндотелиальных клетках всех исследованных областей коры больших полушарий в оба срока наблюдения, а в животных с сахарным диабетом – только на 12-е сутки.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем планируется изучить морфофункциональное состояние нейронов разных участков коры больших полушарий после ишемии-реперфузии головного мозга в динамике (в ранние и поздние сроки постишемического периода) с целью поиска маркеров чувствительности к данной патологии, которая может стать основой патогенетической коррекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Бойчук Т. М., Савчук Т. П. Ультраструктурний стан лімбіко-гіпоталамічних структур мозку щурів з ускладненнєм стрептозотозин-індукованого діабету гострим порушеннєм кровообігу в басейні сонних артерій // Клінічна анатоміє та оперативна хірургіє. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 6-9.
- 2 Кособєн Е. П., арєк-Мартынова И. Р., асаманова А. Н., Колєсникова Т. И., Мартынов М.Я. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии цереброваскулєрного поражєніє у пациентов с сахарным диабетом // Сахарный диабет. – 2012. – № 1.–С. 42–48.
- 3 Люньков О. М. Особливості перебігу ішемічно-реперфузійного пошкодженнє структур головного мозку при експериментальному цукровому діабеті в самців-щурів : авторєф. дис. на здобуттє наук. ступенє канд. мед. наук : спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологіє» / О. М. Люньков. - Чернівці, 2010. – 20 с.
- 4 Скибо Г. Г. Использование различных экспериментальных моделей длє изучєніє клеточных механизмов ишемического поражєніє мозга // Патологіє. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 22-30.
- 5 Ballantyne C. M. Adolescent type 1 Diabetes cardio-renal Intervention Trial (AdDIT) // BMC Pediatr. – 2009. – Vol.9 – P. 79-86.
- 6 Boghdady N.A., Bard G.A. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy // Cell. Biochem. Funct. – 2012. – Vol.30, №4. – P. 328–334.
- 7 Idris I., Thomson G. A., Sharma J. C. Diabetes mellitus and stroke // Int. J. Clin. Pract. – 2006. – V. 60, № 1. – P. 48–56.
- 8 Lam D. W., Le Roith D. The worldwide diabetes epidemic // Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. – 2012. - V. 19, №2– P. 93-96.
- 9 Shaw J. E., Sicree R. A., Zimmet P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 // Diabetes Res. Clin. Pract. – 2010. – Vol. 87, № 1. – P. 4-14.

T. N. BOJCHUK, T. I. KMET

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

REGIONAL CHARACTERISTICS OF RESPONSE OF ENDOTHELIAL CELLS OF CERTAIN FUNCTION AREAS OF THE CEREBRAL CORTEX IN RATS WITH STREPTOZOCIN-INDUCED DIABETES COMPLICATED BY ISCHEMIA-REPERFUSION DAMAGE OF BRAIN

Resume: We found that endothelial cells of the studied areas of the cerebral cortex have individual susceptibility to carotid ischemia-reperfusion.

Diabetes modifies the response of endothelial cells of the studied areas of the cerebral cortex to incomplete global ischemia-reperfusion of brain. Namely it removes reaction of frontal and parietal lobe in the initial of carotid ischemia-reperfusion and limits the response at the 12 day of postischemic period. Diabetes changes the qualitative and quantitative response in the cortex of temporal lobe at both stages of observation.

RNA concentration of studied cells increases under conditions of incomplete global ischemia-reperfusion of brain non-diabetic in endothelial cells of all studied areas of the cerebral cortex in rats at both stages of observation and in diabetic rats at the 12 day of the observation.

Keywords: brain, diabetes mellitus, carotid ischemia-reperfusion, endothelial cell.

Таблица 1 - Динамика изменений показателей морфофункционального состояніє эндотелиоцитов отдельных областей коры больших полушарий крыс в условиєх экспериментального сахарного диабета, осложненного ишемически–реперфузионным поврежденієм головного мозга (M ± m)

Группа наблюдєніє	Плотность клеток (мм ²)	Площадь клетки, мкм ²	Эквивалентный диаметр, мкм	Концентраціє РНК в клетке, E _{оп}
Лобная область коры головного мозга				
Контроль	207,68 ± 5,68	5,90 ± 0,10	2,42 ± 0,03	0,923 ± 0,004
Ишеміє реперфузіє 20 мин / 1 час	195,60 ± 7,16	5,99 ± 0,12	2,40 ± 0,03	1,011 ± 0,006*
Ишеміє реперфузіє 12 суток	258,74 ± 12,91* ^Δ	5,80 ± 0,13	2,38 ± 0,03	1,064 ± 0,009* ^Δ
Диабет	174,51 ± 8,99*	5,91 ± 0,15	2,49 ± 0,04	0,943 ± 0,007*
Диабет и ишеміє реперфузіє 20 мин / 1 час	161,91 ± 8,18	6,03 ± 0,16	2,38 ± 0,04	0,933 ± 0,008
Диабет и ишеміє реперфузіє 12 суток	164,51 ± 8,09	5,84 ± 0,15	2,46 ± 0,03	1,011 ± 0,008#&
Теменная область коры головного мозга				
Контроль	176,68 ± 5,06	5,70 ± 0,13	2,33 ± 0,03	0,919 ± 0,006
Ишеміє реперфузіє 20 мин / 1 час	149,36 ± 8,07*	6,19 ± 0,16*	2,38 ± 0,04	1,006 ± 0,009*

Ишемия-реперфузия 12 суток	155,22 ₇ ,47*	6,08 ₀ ,17	2,48 ₀ ,05*	1,007 ₀ ,010*
Диабет	145,10 ₇ ,57*	6,14 ₀ ,18	2,53 ₀ ,05	0,959 ₀ ,010*
Диабет и ишемия- реперфузия 20 мин / 1 час	136,61 ₇ ,03	5,96 ₀ ,20	2,39 ₀ ,05	0,959 ₀ ,009
Диабет и ишемия- реперфузия 12 суток	154,99 ₇ ,60	6,02 ₀ ,16	2,47 ₀ ,04	1,035 ₀ ,009#&
Височная область коры головного мозга				
Контроль	220,61 ₄ ,41	5,53 ₀ ,10	2,34 ₀ ,03	0,975 ₀ ,005
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 час	198,13 ₇ ,05*	5,94 ₀ ,11*	2,34 ₀ ,03	0,961 ₀ ,005
Ишемия-реперфузия 12 суток	251,13 ₁₂ ,69*^	5,62 ₀ ,13	2,43 ₀ ,03	1,21 ₀ ,01*^
Диабет	183,66 ₇ ,03*	5,88 ₀ ,11	2,48 ₀ ,03*	1,012 ₀ ,007*
Диабет и ишемия- реперфузия 20 мин / 1 час	162,37 ₆ ,04#	5,71 ₀ ,15	2,34 ₀ ,04#	0,889 ₀ ,007#
Диабет и ишемия- реперфузия 12 суток	199,43 ₈ ,84&	5,72 ₀ ,13	2,40 ₀ ,03#	1,066 ₀ ,010#&

Примечание. - достоверность различий по сравнению с: * - контролем; ^ - ишемией-реперфузией (20 мин / 1 ч) у контрольных животных; # - диабетом; & - ишемией-реперфузией (20 мин / 1 ч) у животных с диабетом