

УДК 616.831:-612.176]-092.5-019

О. В. Ткачук

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

РЕАКЦІЯ ІНСУЛІН-ЕКСПРЕСУЮЧИХ КЛІТИН ТИМУСА НА НЕПОВНУ ГЛОБАЛЬНУ ІШЕМІЮ-РЕПЕРФУЗІЮ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В КОНТРОЛЬНИХ ЩУРІВ ТА ТВАРИН ІЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Ключові слова: інсулін-експресуючі клітини, тимус, ішемія-реперфузія мозку, цукровий діабет.

Резюме. Досліджено вплив хронічного іммобілізаційного, пренатального та індукованого ішемією головного мозку стресу на реакцію катехоламінівмісних структур тимуса самців-щурів. Встановлено, що хронічний стрес, незалежно від його природи, знижує інтенсивність флуоресценції катехоламінів у всіх досліджених зонах тимуса, однак, поруч із цим, кожен вид стресу має індивідуальні характеристики стану катехоламінівмісних структур залози.

Вступ

Позапанкреатична експресія інсуліну та її порушення при низці станів, пов'язаних із порушеннями метаболізму вуглеводів на сьогоднішній день не викликає сумнівів. Її наявність доведена для головного мозку, тимуса, селезінки, печінки, кісткового мозку жирової тканини, печінки та ін. тканин, кісткового мозку. Крім того, встановлені її зміни при порушеннях вуглеводного обміну (цукровому діабеті 1 та 2 типів, за умов гіперглікемії), [227]. Доведено, що тимічний інсулін є одним із провідних чинників формування центральної толерантності до β -клітин панкреатичних острівців [камишн.342]. (GAD, карбоксипептидаза H, проглюкагон, просоматостатин, пропанкреатический полипептид и др.)

Експресія інсуліну антигенпрезентуючими клітинами (АПК) тимуса запобігає появі імунних до β -клеткам Т-лімфоцитів. Досі немає єдиної точки зору стосовно клітинної приналежності інсулінекспресуючих клітин тимуса. До них відносять дендритні клітини та макрофаги кістково-мозкового походження але не тимоцити [464]. За іншими даними, здатність до експресії генів сімейства інсуліну мають також тимічні епітеліальні та дендритні клітини [246,317].

Інсулінекспресуючі дендритні клітини і макрофаги є як у тимусі, так і в периферичних лімфоїдних органах людини й мишей. Показано, що проінсулін-позитивні дендритні клітини утворюють розетки, які тісно контактують з апоптотичними клітинами, які їх оточують. Це свідчить на користь того, що АПК мають здатність індукува-

ти апоптоз автореактивних Т-лімфоцитів [490, 542]. Успешным оказалось и использование толерогенных популяций дендритных клеток для предупреждения и модуляции развития сахарного диабета у NOD-мышей [315,601].

Derbinski et al. (2005), Є дані, що досить значні кількості інсуліну в нормальних та NOD-мишей експресуються не дендритними клітками і не макрофагами медулярними епітеліоцитами тимуса [484,485]. Показано, що тимический проінсулін в значних кількостях виявлено в окремих в медулярних епітеліоцитах тимуса, які утворюють тільця Гассала [164,334].

Частина інсулінекспресуючих клітин в наших дослідженнях за їх морфометричними показниками залишилася не ідентифікованою, тому їх ми виділили в окрему групу клітин, оскільки вони характеризуються достатньо високою інсулінімунореактивністю. Найімовірніше, що це антигенпрезентуючі епітеліоретикулоцити кіркової та мозкової речовини тимуса.

Мета дослідження

Дослідити участь інсулін-експресуючих клітин в реакції тимуса контрольних щурів та тварин із експериментальним цукровим діабетом на неповну глобальну ішемію-реперфузію головного мозку.

Матеріал і методи

У шестимісячних інтактних щурів та тварин із чотиримісячним цукровим діабетом моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом 20-хви-

линного двобічного кліпсування загальних сонних артерій [12]. Тварин виводили з експерименту на 12 добу декапітацією під наркозом. Цукровий діабет відтворювали однократним внутрішньочеревинним уведенням стрептозотоцину (Sigma, США, 60 мг/кг маси тіла) білим нелінійним самцям щурів двомісячного віку [6,16]. У дослід брали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Тривалість діабету – чотири місяці. Тимус 18 год фіксували в розчині Буена, здійснювали стандартну гістологічну обробку, заливали в парафін, готували серійні зрізи товщиною 5 мкм після їх регідрування і 24-годинної інкубації з IgG1 мишей до CD4 та CD8 щура, кон'югованими з FITS (Beckman Coulter, США). Імуногістохімічним методом прямої імуофлуоресценції визначали експресію CD4-маркерів Т-лімфоцитів хелперів та CD8-маркерів Т-лімфоцитів, які виконують функцію супресорів.

На флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP вивчали клітини кіркової та мозкової зон тимуса. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Ідентифікацію клітин в отриманому зображенні проводили за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5, розробленого на основі макроязика програмування VIDAS [1,14].

Результати досліджень опрацьовано за допомогою пакета прикладних програм "Statistica ("Statsoft", США). Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних виборок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Обговорення результатів дослідження

Аналіз отриманих результатів показав, що на 12 добу ішемічно-реперфузійного періоду відбулося достовірне зниження тимічних інсулін-імунопозитивних макрофагів та не ідентифікованих клітин (табл.1). Кількість дендритних клітин залишилася незмінною. Виник також перерозподіл всіх типів інсулін-імунопозитивних клітин: зменшився відсоток макрофагів та зріс – дендритних і неідентифікованих клітин. Цікаво, що чотиримісячний цукровий діабет мав навіть дещо менші наслідки щодо змін тимічних інсулін-імунопозитивних клітин – нами виявлено зниження щільності розташування лише не ідентифікованих клітин.

Менш суттєвим був і відсотковий перерозподіл: до такого ж рівня, як і після ішемії-реперфузії зріс відсоток дендритних клітин, проте знизився відсоток неідентифікованих при незмінному показнику макрофагів. Реакція інсулін-імуно-

позитивних клітин тимуса на ішемію-реперфузію у тварин із цукровим діабетом мала як спільні з контрольними тваринами, так і відмінні риси. Як і в групі контролю відбулося зниження щільності розташування макрофагів, незмінною залишилася щільність дендритних клітин, проте достовірно зросла щільність неідентифікованих клітин. Виявлено спільні риси (зниження відсотка макрофагів та зростання – неідентифікованих клітин) та відмінності (зниження відсотка дендритних клітин) і в показниках відсоткового розподілу.

Описані результати свідчать, що реакція інсулін-імунопозитивних клітин тимуса на різні захворювання з автоімунним компонентом має як неспецифічні, так і специфічні риси. Той факт, що чотиримісячний цукровий діабет супроводжується менш суттєвими порушеннями загальної картини щільності розташування інсулін-імунопозитивних клітин тимуса, порівняно з подібними за умов ішемії-реперфузії, може мати пояснення в різних термінах спостереження розвитку автоімунного процесу.

Для оцінки ступеня отриманих порушень за модельованих патологічних станів важливе значення має визначення концентрації інсуліну в інсулін-імунопозитивних клітинах тимуса. Результати даного дослідження наведено в табл. 2.

Із наведених даних видно, що зниження щільності розташування макрофагів у тимусі після ішемії-реперфузії супроводжується зростанням у них концентрації інсуліну, у той же час, зниження щільності неідентифікованих клітин за цих умов характеризується і зниженням концентрації в цих клітинах інсуліну. Таким чином, в кінцевому результаті загальна кількість інсуліну в залозі буде знижена.

Незважаючи на незмінну щільність розташування макрофагів і дендритних клітин і знижену – неідентифікованих, у щурів із діабетом у всіх типах клітин виявлено зростання концентрації інсуліну, що, ймовірно, носить компенсаторний характер. Однак аналіз вмісту інсуліну в досліджених клітинах тимуса тварин із діабетом показав його достовірне тотальне зниження, що суттєво відрізняється від реакції даного показника на ішемію-реперфузію. Отже, сукупний аналіз результатів проведених досліджень свідчить про наявність специфічної діабет-обумовленої реакції інсулін-імунопозитивних клітин тимуса на ішемічно-реперфузійне пошкодження нервової тканини. Це може відображати ефекти взаємного обтяження двох патологічних процесів з автоімунними проявами за рахунок порушення негативної селекції β-клітинних автореактивних клонів у тимусі можуть быть либо слабое представительство

Таблиця 1

Кількість (на 1мм²) інсулінімунопозитивних клітин у тимусі щурів після ішемії-реперфузії головного мозку (M ± m)

Серії дослідження	Інсулін-імунопозитивні клітини		
	Макрофаги	Дендритні клітини	Неідентифіковані клітини
Контроль	10,57±1,24	11,60±1,29	7,87±0,76
	35,78±1,02	38,90±1,01	25,68±0,96
Ішемія-реперфузія	7,05±0,90*	10,80±1,22	5,60±0,85*
	29,68±0,87*	45,45±1,26*	28,83±0,78*
Діабет 4 міс.	9,57±0,87	11,42±1,05	5,96±0,65*
	35,51±0,92	42,37±1,13*	22,11±0,62*
Діабет та ішемія-реперфузія	7,38±0,58^	9,96±0,80	9,09±0,88^
	27,90±1,11^	37,69±1,06^	34,36±1,18^

Примітка. у чисельнику - щільність розташування популяції інсулінімунореактивних клітин (на 1 мм²); у знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин; вірогідність змін щодо показників – * – у контрольних тварин; ^ – у тварин із цукровим діабетом

Таблиця 2

Концентрація інсуліну (Е_{инф}) в тимусі щурів після ішемії-реперфузії головного мозку (M ± m)

Серії дослідження	Інсулін-імунопозитивні клітини		
	Макрофаги	Дендритні клітини	Неідентифіковані клітини
Контроль	0,621±0,012	0,560±0,010	0,480±0,011
Ішемія-реперфузія	0,687±0,021* p<0,01	0,547±0,016	0,432±0,018* p<0,01
Діабет 4 міс.	0,707±0,011* p<0,001	0,621±0,008* p<0,001	0,556±0,011* p<0,001
Діабет та ішемія-реперфузія	0,669±0,014^ p<0,025	0,537±0,011^ p<0,001	0,450±0,008^ p<0,001

Примітка. вірогідність змін щодо показників – * – у контрольних тварин; ^ – у тварин із цукровим діабетом

антигенов β-кліток в доступній формі всередині тимуса. Либо изменение числа и морфофункциональных свойств АПК.

Висновки

1. У контрольних щурів ішемія-реперфузія головного мозку знижує щільність розташування в тимусі макрофагів, неідентифікованих клітин, концентрацію в останніх інсуліну та її підвищення в тимічних макрофагах.

2. Чотиримісячний стрептозотозин-індукований цукровий діабет знижує в тимусі щільність розташування неідентифікованих інсулін-експресуючих клітин та підвищує концентрацію інсуліну в усіх досліджених інсулін-експресуючих клітинах.

3. У щурів зі стрептозотозинним діабетом ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку знижує щільність розташування в тимусі інсулін-експресуючих макрофагів та підвищує щільність інсулін-експресуючих не ідентифікованих клітин. У тварин даної експериментальної групи в усіх типах інсулін-експресуючих клітин виявлено достовірне зниження концентрації інсуліну.

Перспективи подальших досліджень

Отримані результати обґрунтовують доцільність подальших досліджень ролі тимічних гормонів у розвитку та перебігу аутоімунної патології.

Література. 1. *Алгоритм* автоматичного аналізу лімфоїдної популяції тимуса А.В.Абрамов, Ю.М.Колесник, В.А.Любомирська, О.М.Камішний // Вісн. морфол. - 2002 - № 2. - С.361-362. 2. *Камышный А. М.* Экстрапанкреатическая секреция инсулина при сахарном диабете / А. М. Камышный, Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов // Запорож. мед. журн. - 2006. - № 6. - С. 5–12. 3. *Колесник Ю. М.* Характеристика інсулін-експресуючих клітин тимуса у нападків щурів з експериментальним гестаційним діабетом / Ю. М. Колесник, О. М. Камішний, А. В. Абрамов // Ендокринологія. - 2007. - № 1. - С. 92–99. 4. *Скибо Г. Н.* Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г. Н. Скибо // Патология. - 2004. - Т. 1, № 1. - С. 22-30. 5. *Ткачук О.В.* Морфологічний стан острівців підшлункової залози у віддаленому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку контрольних щурів та щурів зі стрептозотозин-індукованим цукровим діабетом / О.В.Ткачук, В.П.Пішак, О.М.Леньков // Клініч. та експерим. патол. - 2011. - Т. X, №1. - С. 152-155. 6. *Углеводный обмен* у больных с церебральным инсультом / Т.В.Волченкова, И.Г.Колчу, Е.В.Исакова, С.В.Котов // Бюлл. сибирской мед. - 2010. - №4. - С. 35-38. 7. *Эффекты* многократного введения нейропептида Y на структуру лимфоидной популяции тимуса в норме и при экспериментальном сахарном диабете / А.В.Абрамов, А.М.Камышный, В.А.Любомирская, Ю.М.Колесник // Запорож. мед. журн. - 2003. - №5. - С.4-6. 8. *Disorders of Glucose Metabolism in Acute Stroke Patients*

/ K. Matz, K. Keresztes, C. Tatschl [et al.] // *Diabetes Care*. - 2006. - Vol. 29, № 4. - P. 792-797. 9. *Dungan K.M. Stress hyperglycaemia* / K.M. Dungan, S.S. Braithwaite, J.C. Preiser // *Lancet*. - 2009. - Vol. 23, № 373. - P. 1798-1807. 10. *Dynamic of Hyperglycemia as a Predictor of Stroke* [Электронный ре-супс] / M. Yong, M. Kaste // *Stroke*. - 2008. - Vol. 39. - P. 2749-2755. - Режим доступа до журн.: <http://stroke.ahajournals.org>. 11. *Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes* / H. Kojima, M. Fujimiya, K. Matsumura [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2004. - Vol. 101. - P. 2458-2463. 12. *Geenen V. Role of the thymus in the development of tolerance and autoimmunity towards the neuroendocrine system* / V. Geenen, F. Brilot // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2003. - Vol. 992. - P. 186-195. 13. *Grant P.S. A prospective, observational study of the management of hyperglycaemia in acute stroke. What is the optimum level of blood glucose at which to intervene?* / P.S. Grant, K. Ali // *Brit. J. Diabetes & Vascular Dis.* - 2010. - Vol. 10, № 6. - P. 287-291. 14. *Idris I. Diabetes mellitus and stroke* / I. Idris, G.A. Thomson, J.C. Sharma // *Int. J. Clin. Pract.* - 2006. - Vol. 60, № 1. - P. 48-56. 15. *Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse* / R. Kumari, L.B. Willing, J.K. Krady [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow. Metabol.* - 2007. - Vol. 27, № 4. - P. 710-718. 16. *In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow* / D. Tang, L. Cao, B. Burkhardt [et al.] // *Diabetes*. - 2004. - Vol. 53. - P. 1721-1732.

**РЕАКЦИЯ ИНСУЛИН-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
КЛЕТОК ТИМУСА НА НЕПОЛНУЮ
ГЛОБАЛЬНУЮ ИШЕМИЮ-РЕПЕРФУЗИЮ
ГОЛОВНОГО МОЗГА У КОНТРОЛЬНЫХ КРЫС
И ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ
САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

А. В. Ткачук

Резюме. Исследовано влияние двусторонней каротидной ишемии-реперфузии на реакцию инсулин-экспрессирующих клеток тимуса у контрольных крыс и животных с сахарным диабетом. Показано, что у контрольных крыс ишемия-реперфузия головного мозга снижает плотность расположения в

тимусе инсулин-экспрессирующих макрофагов, неидентифицированных клеток, концентрацию в последних инсулина и повышает содержание гормона в тимических макрофагах. У крыс с диабетом подобное вмешательство снижает плотность расположения в тимусе инсулин-экспрессирующих макрофагов, концентрацию инсулина во всех типах исследованных клеток и повышает плотность инсулин-экспрессирующих неидентифицированных клеток.

Ключевые слова: инсулин-экспрессирующие клетки тимуса, ишемия-реперфузия мозга, сахарный диабет.

**THE REACTION OF THE THYMUS INSULIN-
EXPRESSING CELLS ON THE GLOBAL ISCHEMIA-
REPERFUSION OF THE BRAIN IN CONTROL RATS
AND ANIMALS WITH EXPERIMENTAL DIABETES
MELLITUS**

A. V. Tkachuk

Abstract. The influence of the bilateral carotid ischemia-reperfusion on the thymus insulin-expressing cells in control rats and animals with streptozotocin-induced diabetes mellitus has been investigated. It has been shown that brain ischemia-reperfusion in control rats reduces density of insulin-expressing macrophages and unidentified cells, concentration of insulin in the past and enhances hormone content in thymus macrophages. In rats with diabetes this intervention reduces the density of insulin-expressing macrophages and insulin concentration in all types of studied cells and increases the density of insulin-expressing unidentified cells in thymus.

Key words: thymus insulin-expressing cells, brain ischemia-reperfusion, diabetes mellitus.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2011. - Vol. 10, № 2 (36). - P. 102-105.

Надійшла до редакції 24.05.2011

Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький

© О. В. Ткачук, 2011