

УДК 61.831-06:616-005]-053-08

О. В. Ткачук

Буковинський державний медичний  
університет, м. Чернівці

## ВПЛИВ НЕПОВНОЇ ГЛОБАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ НА ІНСУЛІНПРОДУКУЮЧУ ФУНКЦІЮ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В КОНТРОЛЬНИХ ЩУРІВ ТА ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ

**Ключові слова:** інсулінпродукуюча функція підшлункової залози, неповна глобальна ішемія-реперфузія головного мозку, цукровий діабет.

**Резюме.** Досліджено вплив ішемії-реперфузії головного мозку на інсулінпродукуючу функцію підшлункової залози в контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом. Показано, що чотиримісячний цукровий діабет та ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних щурів зменшують кількість  $\beta$ -клітин в острівцях, концентрацію в них інсуліну, загальний уміст і концентрацію інсуліну в усіх типах острівців. Більш суттєві наслідки цукрового діабету, порівняно з такими за умов ішемії-реперфузії головного мозку в контрольних щурів, визначаються, переважно, у великих острівцях. Ішемія-реперфузія головного мозку в щурів із цукровим діабетом не впливає на зазначені показники в жодному типі вивчених острівців.

### Вступ

Цукровий діабет вважається незалежним предиктором виникнення інсультів [1-3]. За даними різних дослідників, у хворих на цукровий діабет частота гострих розладів церебрального кровообігу зростає у 2-4 рази порівняно з пацієнтами без діабету [3, 12]. Діабет стає причиною смертності від інсульта в 16 % чоловіків та 33 % жінок [11, 12]. Однак, аналіз літературних даних, присвячених ролі гіперглікемії в перебігу гострих порушень мозкового кровообігу, показує обтяжуючий вплив гіперглікемії як у пацієнтів, що страждають на цукровий діабет, так і в тих, що не мали в анамнезі порушень вуглеводного обміну [4-6]. Встановлено, що в пацієнтів з ішемічними інсультами, які супроводжуються транзиторною гіперглікемією, при комп'ютерному скануванні мозку діагностується більш обширна зона некрозу, має місце вищий рівень летальності упродовж 30 днів, ніж у пацієнтів із нормоглікемією [7].

Недавніми дослідженнями показано, що більше половини хворих, які перенесли інсульт чи транзиторну ішемічну атаку, у подальшому мали порушений глюкозотолерантний тест чи діабет [9]. Серед тих, у кого в постінсультному періоді було виявлено цукровий діабет, 40 % раніше не мали порушень вуглеводного обміну. Ці факти констатують взаємообумовленість ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку та порушення вуглеводного обміну, не даючи відповіді на питання про первинність того чи

іншого чинника.

Отже, незважаючи на багатолітні дослідження, патогенез погіршеного перебігу гострих розладів мозкового кровообігу за наявності гіперглікемії та причин її виникнення у хворих без діабету залишається точно не визначеним. На сьогоднішній день найбільш ймовірними причинами розвитку гіперглікемії вважають посилення імунної відповіді, формування неспецифічного адаптаційного синдрому (стрес-реакції), внаслідок чого активується гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова система, підвищується рівень катехоламінів, глюкокортикоїдів, глюкагону та ін. контрінсулярних гормонів [10, 12, 18]. Однак, є роботи, в яких показано, що гіперглікемія виникає і у хворих на ішемічні інсульти без підвищення рівня вказаних гормонів [13]. Це свідчить, що остаточно патогенез гіперглікемії у хворих із гострими порушеннями церебрального кровообігу залишається не встановленим, що вказує на актуальність подібних досліджень.

### Мета роботи

Вивчити вплив ішемії-реперфузії головного мозку на інсулінпродукуючу функцію острівців підшлункової залози в контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом.

### Матеріал і методи

Цукровий діабет відтворювали однократним внутрішньочеревним введенням стрептозоточину (Sigma, США, 60 мг/кг маси тіла) білим нелінійним самцям щурів двомісячного віку [8].

У дослід брали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Тривалість діабету – чотири місяці. У частини шестимісячних інтактних щурів та тварин з експериментальним цукровим діабетом моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом 20-хвилинного двобічного кліпсування загальних сонних артерій [16]. Тварин виводили з експерименту на 12 добу декапітацією під наркозом. Підшлункову залозу 18 год фіксували в розчині Буена, здійснювали стандартну гістологічну обробку, заливали в парафін, після регідрування готували серійні зрізи товщиною 5 мкм. Інсулін у  $\beta$ -клітинах визначали методом непрямой імунофлуоресценції. Регідровані гістологічні зрізи залози 45 хв ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ) інкубували в термостаті у вологій камері з 0,1% розчином трипсину для звільнення антигенних ділянок молекул інсуліну, двічі по 5 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2), протягом 30 хв ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ) інкубували з нормальною козячою сироваткою, потім – із первинними кролячими антитілами до інсуліну (розведення 1:200) протягом 6 год при  $T=4^{\circ}\text{C}$  (антитіла фірми Peninsula Laboratories Inc., США). Надлишок первинних антитіл відмивали в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хв ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ) зі вторинними антитілами, кон'югованими з FITC (розведення 1:100), промивали 0,1 М фосфатним буфером, заключали в суміш гліцерину і фосфатного буфера (9:1) для флуоресцентної мікроскопії.

Імунофлуоресценцію, пов'язану з умістом інсуліну в  $\beta$ -клітинах, вивчали в ультрафіолетовому спектрі збудження 390-420 нм. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [14].

Визначали також загальний уміст гормону в острівцях (похідне площі імунореактивного матеріалу та концентрації інсуліну).

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

Для характеристики функціонального стану острівців підшлункової залози щурів після неповної глобальної ішемії-реперфузії головного мозку в контрольних щурів та тварин із діабетом ми дослідили наступні параметри: кількість клітин в острівці, концентрацію інсуліну в клітині, вміст та концентрацію інсуліну в острівці.

Результати вивчення даних показників представлені в таблиці.

Нами встановлено, що стрептозотоцин-індукований цукровий діабет та ішемія-реперфузія головного мозку у тварин контрольної групи і щурів із діабетом призвели до появи поодиноких  $\beta$ -клітин, відсутніх у тварин контрольної групи. Вивчення їх функціонального стану показало, що загальний уміст та концентрація інсуліну в цих клітинах у всіх експериментальних групах достовірно не відрізнялися (таблиця).

У контрольних щурів після ішемії-реперфузії головного мозку кількість клітин у малих острівцях знизилася на 32 %, концентрація інсуліну в клітині – на 31 %, уміст інсуліну в острівцях та концентрація в них гормону – на 82 та 64 % відповідно. Цукровий діабет знизив кількість клітин в острівці більш суттєво – на 78 %, концентрацію інсуліну в  $\beta$ -клітинах – на 17 %, а вміст інсуліну та його концентрацію в острівці – на 116 та 33 %. У тварин із цукровим діабетом ішемія-реперфузія головного мозку не вплинула на жоден із досліджених показників порівняно з такими за умов діабету, хоча стосовно показників у контрольних щурів за поєднаної патології всі параметри були достовірно нижчими.

Суттєвих змін за модельованих нами патологічних станів зазнала інсулінпродукуюча функція середніх острівців. У контрольних щурів ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку спричинило зниження кількості  $\beta$ -клітин в острівцях даного типу на 27 %. Концентрація інсуліну в клітинах також знизилася (на 45 %), як і вміст та концентрація інсуліну в острівці (на 84 та 91 % відповідно).

Вплив цукрового діабету на кількість  $\beta$ -клітин у середніх острівцях був таким же, як і в попередній експериментальній групі, а на решту зазначених параметрів – навіть дещо нижчим: концентрація інсуліну в клітинах знизилася на 26 %, уміст та концентрація інсуліну в острівці – на 63 та 65 % відповідно.

У великих острівцях контрольних щурів після ішемії-реперфузії головного мозку кількість клітин знизилася на 71 %, концентрація інсуліну в клітині – на 28 %, уміст інсуліну в острівці та концентрація в ньому гормону – на 119 та 91 % відповідно.

У великих острівцях цукровий діабет знизив кількість клітин найбільш суттєво – на 151 %, концентрацію інсуліну в  $\beta$ -клітинах – на 20 %, а вміст інсуліну та його концентрацію в острівці – на 189 та 175 %.

Як і в попередніх класах острівців, у тварин

Таблиця

**Показники інсулінпродукуючої функції острівців підшлункової залози в контрольних шурів та тварин із цукровим діабетом після неповної глобальної ішемії-реперфузії головного мозку ( $M \pm m$ )**

Тип острівця	Група спостереження	Кількість клітин в острівці	Концентрація інсуліну в клітині	Вміст інсуліну в острівці	Концентрація інсуліну в острівці
Поодинокі бета клітини	Контроль	-	-	-	-
	Ішемія-реперфузія	1±0	1,09±0,06	56,69±9,26	0,767±0,170
	Діабет	1±0	1,15±0,003	48,05±5,82	0,769±0,101
	Діабет та ішемія-реперфузія	1±0	1,16±0,02	56,42±5,17	0,898±0,132
Малі острівці	Контроль	8,75±0,67	1,305±0,015	564,1±42,8	0,931±0,021
	Ішемія-реперфузія	6,63±0,58 p<0,05	0,995±0,02 p<0,005	310,0±24,7 p<0,001	0,567±0,028 p<0,001
	Діабет	4,90±0,40 p<0,05	1,12±0,02 p<0,001	261,4±19,6 p<0,001	0,701±0,022 p<0,001
	Діабет та ішемія-реперфузія	5,17±0,047	1,143±0,020	277,7±23,1	0,676±0,029
Середні острівці	Контроль	30,62±1,72	1,196±0,031	1797±89	0,791±0,034
	Ішемія-реперфузія	24,00±2,10 p<0,05	0,822±0,017 p<0,001	979,7±123,7 p<0,005	0,413±0,052 p<0,001
	Діабет	24,18±1,52 p<0,05	0,948±0,031 p<0,001	1099±101 p<0,005	0,479±0,037 p<0,001
	Діабет та ішемія-реперфузія	25,46±2,55	0,950±0,033	1156±90	0,500±0,033
Великі острівці	Контроль	68,72±3,43	1,034±0,025	3501±176	0,686±0,042
	Ішемія-реперфузія	40,11±2,74 p<0,001	0,807±0,020 p<0,001	1593±98 p<0,001	0,359±0,029 p<0,001
	Діабет	27,33±2,71 p<0,001	0,857±0,030 p<0,001	1208±311 p<0,001	0,249±0,056 p<0,001
	Діабет та ішемія-реперфузія	25,14±1,90	0,798±0,090	1091±146	0,225±0,027
Гігантські острівці	Контроль	132,1±9,2	0,959±0,018	6427±508	0,609±0,041
	Ішемія-реперфузія	144,5±13,4	0,980±0,020	7156±757	0,630±0,071
	Діабет	-	-	-	-
	Діабет та ішемія-реперфузія	-	-	-	-

Примітка: p – достовірність змін щодо показників у контрольних тварин

із цукровим діабетом ішемія-реперфузія головного мозку не вплинула на жоден із досліджених показників порівняно з такими за умов діабету, хоча стосовно показників у контрольних шурів за поєднаної патології всі параметри були достовірно нижчими. Це дозволяє вважати, що чотиримісячний цукровий діабет вичерпує функціональні

можливості підшлункової залози, унеможливаючи її реакцію на додаткові стимули.

Таким чином, ми бачимо, що в експерименті ішемія-реперфузія головного мозку суттєво впливає на інсулінпродукуючу функцію підшлункової залози, а гіперглікемія, притаманна цьому виду гострого порушення мозкового кровообігу,

може мати морфологічні витоки. Отримані дані підтверджують результати наших попередніх досліджень, які демонструють зменшення площі інсулінімунореактивного матеріалу та коефіцієнту заповненості даним матеріалом малих, середніх і великих острівців підшлункової залози після ішемії-реперфузії головного мозку в контрольних тварин та відсутність впливу останньої в шурів із діабетом [17]. Оцінюючи результати даного дослідження в сукупності з раніше отриманими [15] можна сказати, що більш суттєвий вплив цукрового діабету на морфофункціональний стан острівцевого апарату підшлункової залози порівняно з тим, що має місце за умов ішемії-реперфузії в контрольних шурів, здійснюється на рівні гігантських та великих острівців, а також за рахунок більш вагомого зниження загальної маси  $\beta$ -клітин у всіх острівцях залози.

### Висновки

1. Чотиримісячний цукровий діабет та ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних шурів зменшують кількість  $\beta$ -клітин в острівцях, концентрацію в них інсуліну, загальний уміст і концентрацію інсуліну в усіх типах острівців. Більш суттєвий вплив цукрового діабету на досліджені показники здійснюється, переважно, на рівні великих острівців.

2. Ішемія-реперфузія головного мозку в шурів із цукровим діабетом не впливає на зазначені показники в жодному типі острівців.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується вивчити морфофункціональний стан острівців підшлункової залози шурів після ішемії-реперфузії головного мозку в динаміці (у більш пізні терміни постішемічного періоду) з метою визначення можливості регенерації інсулярного апарату.

### Література

1. Admission hyperglycaemia predicts a worse outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis / A.Y.Poppe, S.R.Majumdar, T.Jeerakathil [et al.] // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol.32. – P. 617-622.
2. Allport L.E. Hyperglycaemia and the ischaemic brain: continuous glucose monitoring and implications for therapy / L.E.Allport, T.A.Baird, S.M.Davis // *Curr. Diabetes Rev.* – 2008. – №4. – P. 245-257.
3. Hyperglycemia, diabetes and stroke: Focus on the cerebrovasculature / Ergul A., Li W., Elgebaly M.M. [et al.] // *Vascul. Pharmacol.* – 2009. – Vol.51. – P. 44-49.
4. 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, Khalid Ali // *Brit. J. Diabet. And Vascular Dis.* – Vol.10, Is. 6. – P. 287-291.
5. Guyomard V. Optimum control of blood glucose for prevention and treatment of ischemic and hemorrhagic stroke / V.Guyomard, P.K.Myint // *Curr. Treat Options Cardiovasc. Med.* – 2009. – Vol.11. – P. 201-211.
6. Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data / D.E.Griesdale, R.J.de Souza, R.M.van Dam // *C.M.A.J.* – 2009.

– Vol.180. – 821-827.

7. Johnston K.C. Glucose Regulation in Acute Stroke Patients (GRASP): a randomised pilot trial / K.C.Johnston // *Stroke*. – 2009. – Vol.40. – P. 3804-3809.

8. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes / A.A.Mic, F.A.Mic, C.A.Tatu [et al.] // *Compar. Med.* – 2007. – Vol.57, № 5. – P. 476-481.

9. Poststroke hyperglycemia. Natural history and immediate management / C.S.Gray, A.J.Hildreth, K.G.M.M.Alberti [et al.] // *Stroke*. – 2004. – Vol.35. – P. 122-126.

10. Quinn T.J. Hyperglycaemia in acute stroke: to treat or not to treat / T.J.Quinn, K.R.Lees // *Cerebrovasc. Dis.* – 2009. – Vol.27, suppl. 1. – P.148-55.

11. Selecting a measurement model for the analysis of the national institutes of health stroke scale / C.Iramaneerat, E.V.Jr.Smith, S.R.Millis // *Int.J.Neurosci.* – 2009. – Vol.119. – P.1042-1059.

12. Ho J.E. Is diabetes mellitus a cardiovascular disease risk equivalent for fatal stroke in women? Data from the Women's Pooling Project / J.E.Ho, F.Paultre, L.Mosca // *Stroke*. – 2003. – Vol.34. – P. 2812-2816.

13. Why Does Acute Hyperglycemia Worsen the Outcome of Transient Focal Cerebral Ischemia? Role of Corticosteroids, Inflammation, and Protein O-Glycosylation / A.M.Planas A.Martin, S.Rojas, A.Chamorro // *Stroke*. – 2006. – Vol.37. – P.1288-1295.

14. Колесник Ю.М. Морфофункціональне состояние островков Лангерганса интактных самцов крыс линии Wistar в возрастном аспекте / Ю.М.Колесник, Т.А.Грекова // *Патологія*. – 2009. – Т.6, №2. – С. 73-78.

15. Морфологічний стан острівців підшлункової залози у віддаленому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку контрольних шурів та шурів зі стрептозототин-індукованим цукровим діабетом / О.В.Ткачук, В.П.Пішак, О.М.Леньков [та ін.] // *Клінічна та експериментальна патологія*. – 2011. – Т. X, №1(35). – С. 152-155.

16. Скибо Г.Н. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г.Н.Скибо // *Патологія*. – 2004. – Т.1, №1. – С. 22-30.

17. Ткачук О.В. Морфофункціональний стан острівців підшлункової залози шурів із поєднаним впливом цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку / О.В.Ткачук // *Буковинський медичний вісник*. – 2011. – Т.15, №3 (59). – С.102-104.

18. 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.

### ВЛИЯНИЕ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КОНТРОЛЬНЫХ КРЫС И КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ

*А.В.Ткачук*

Исследовано влияние ишемии-реперфузии головного мозга на инсулинпродуцирующую функцию поджелудочной железы у контрольных крыс и животных с сахарным диабетом. Показано, что ишемия-реперфузия головного мозга у контрольных крыс, как и четырехмесячный сахарный диабет, уменьшают количество  $\beta$ -клеток в островках, концентрацию в них инсулина, общее содержание и концентрацию инсулина во всех типах островков. Более существенные последствия сахарного диабета, по сравнению с таковыми при ишемии-реперфузии головного мозга у контрольных животных, определяются, преимущественно, в больших островках. Ишемия-реперфузия головного мозга у крыс с сахарным диабетом не влияет на изученные показатели ни в одном из изученных типов островков.

**Ключевые слова:** инсулинпродуцирующая функция поджелудочной железы, неполная глобальная ишемия-реперфузия головного мозга, сахарный диабет.

**INFLUENCE OF INCOMPLETE GLOBAL ISCHEMIA-  
REPERFUSION OF THE BRAIN ON INSULINPRODUC-  
TION PANCREATIC FUNCTION IN THE CONTROL  
RATS AND RATS WITH STREPTOZOTOCIN-IN-  
DUCED DIABETES**

*O.V.Tkachuk*

The influence of the brain ischemia-reperfusion on insulin-production pancreatic function in the control rats and animals with diabetes mellitus has been studied. It has been shown that ischemia-reperfusion of the brain in control rats, as well as a four-month diabetes, reduce the amount of  $\beta$ -cells in the islets, the concentration at which insulin, total content and concentration of insulin in all islets types. More significant effects of diabetes, compared with those in ischemia-reperfusion of the

brain in the control animals, are determined mainly in the large islands. Ischemia-reperfusion of the brain in rats with diabetes does not affect the studied parameters in any of the studied types of islets.

**Key words:** insulinproduction pancreatic function, incomplete global ischemia-reperfusion, diabetes mellitus.

**Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)**

*Clin. and expir. pathol. - 2011.- Vol.10, №4 (38).-P.93-97*

*Надійшла до редакції 17.09.2011*

*Рецензент - проф. В. Ф. Мислицький*

*© О.В. Ткачук, 2011*