

УДК 616.831-005.4:616.379-008.64]:577.1-019

С. С. Ткачук
О. М. ЛеньковБуковинський державний медичний
університет, м. ЧернівціЕКСПРЕСІЯ БІЛКІВ HIF-1 α , P53 ТА BCL-2
В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЗА УМОВ
ДВОБІЧНОЇ КАРОТИДНОЇ ІШЕМІЇ-
РЕПЕРФУЗІЇ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ
В САМЦІВ-ЩУРІВ**Ключові слова:** каротидна ішемія-
реперфузія, головний мозок,
цукровий діабет, Hif-1 α , p53, Bcl-2.**Резюме.** Досліджено вплив двобічної каротидної ішемії-реперфузії головного мозку на рівні експресії білків Hif-1 α , p53 та Bcl-2 у корі лобової частки та різних полях гіпокампа при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті в самців-щурів. Ішемія-реперфузія на тлі цукрового діабету підвищує експресію білків Hif-1 α і Bcl-2 в корі лобової частки. У гіпокампі за цих же умов зростає експресія білків p53 та Bcl-2.**Вступ**

Гостра ішемія головного мозку є надзвичайно важливою медичною й соціальною проблемою. У більшості країн інсульт посідає 2–3 місце в структурі загальної смертності населення [2, 11]. Особливо важливим є те, що зростання даної патології має місце в осіб працездатного віку. Таким чином, гостра ішемія головного мозку багато в чому є визначальною щодо рівня здоров'я й тривалості життя, тим більше, що ішемічні пошкодження мозку можуть бути наслідком не лише судинної патології, але й черепно-мозкових травм, судинно-серцевих захворювань, системних порушень метаболізму. До останніх належить цукровий діабет (ЦД), ускладнення якого часто призводять до ішемічних станів головного мозку [6].

В останні роки значну увагу дослідників привертає реакція геному на різні патологічні стани. Так, досліджуються гени раннього реагування, гени, що кодують білки теплового шоку і молекули універсальних регуляторів клітинних процесів, а також гени, які контролюють процеси програмованої клітинної смерті [1, 2, 3, 7-9]. Для наших досліджень ми обрали білки, що експресуються генами Bcl-2, p53 і Hif-1 α . Зміни в синтезі цих протеїнів за умов ішемії та різних порушень метаболізму активно вивчаються [4, 5, 10]. Проте інформації про таку реакцію за умов поєднання цукрового діабету і ішемії-реперфузії головного мозку ми не знайшли, що обумовлює доцільність даного дослідження.

Мета дослідження

Дослідити вплив двобічної каротидної ішемії-реперфузії при цукровому діабеті на експресію білків Bcl-2, p53 та Hif-1 α у корі лобової частки та різних полях гіпокампа самців-щурів.

Матеріал і методи

Експериментальні моделі виконані на самцях білих нелінійних щурів чотирьох груп: контрольні тварини, щури, яким виконано двобічну каротидну ішемію-реперфузію (ДКІР), щури з ЦД і щури з ЦД, яким виконано ДКІР.

Цукровий діабет моделювали у двомісячних тварин, яким внутрішньоочеревинно одноразово вводили стрептозотоцин (Sigma, Aldrich, США) в дозі 60 мг/кг маси тіла. У дослід брали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Тривалість діабету становила три місяці. ДКІР моделювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг) шляхом двадцятихвилинного перетискання обох загальних сонних артерій з односторонньою реперфузією в щурів віком 5 місяців. Тварин виводили з експерименту декапітацією під каліпсоловим наркозом. Головний мозок 24 год фіксували в розчині Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін, готували серійні зрізи товщиною 5 мкм, здійснювали депарафінізацію, регідрацію та відмивання в 0,1 М фосфатному буфері. Оброблені за гістохімічними методами імунофлуоресценції з моноклональними антитілами, зрізи вивчали у флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP (ZEISS, Німеччина). Досліджували щільність розташування Bcl-2-, p53- та Hif-1 α -позитивних клітин у комп'ютерній системі цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина).

Обговорення результатів дослідження

Результати дослідження представлені в табл. 1-4.

У зв'язку з великою щільністю клітин у гіпокампі неможливо виокремити нейро- і гліоцити, тому показники експресії в гіпокампі подаються у вигляді площі імунореактивного матеріалу (ІРМ) на 10000 мкм². У такому ж вигляді подані

й дані дослідження експресії Hif-1 α в корі лобової частки, оскільки імунореактивні мітки в цій структурі також розташовуються дифузно.

У корі лобової частки (КЛЧ) тварин, яким виконана ДКІР, порівняно з контролем вірогідно збільшилася площа Hif-1 α -ІРМ у 2,8 раза. Діабет по відношенню до групи контролю спричинив зростання цього показника в 4,3 раза. При поєднаній дії тримісячного цукрового діабету та ішемії-реперфузії порівняно із групою тримісячного діабету в цій структурі площа Hif-1 α -ІРМ підвищилася у 2,9 раза (табл. 1).

Експресія білка p53 не зазнала вірогідних змін у корі лобової частки в жодній експериментальній групі (табл. 2).

У КЛЧ тварин, яким виконана двобічна каротидна ішемія-реперфузія, порівняно з контрольною групою зросла кількість Vcl-2+-нейроцитів в 1,6 раза. ЦД не спричинив вірогідних змін кількості Vcl-2+-нейро- чи гліоцитів по відношенню до контрольних тварин. ДКІР на тлі цукрового діабету порівняно з групою ЦД без порушення мозкового кровообігу викликала збільшення щільності Vcl2+-нейроцитів в 1,9 раза і сумарної кількості Vcl2+-клітин – в 1,4 раза (табл. 3).

У гіпокампі експресія Hif-1 α , p53 і Vcl-2 зазнали таких змін (табл. 4).

В усіх досліджуваних полях не виявлено вірогідних змін експресії Hif-1 α в жодній експериментальній групі.

У полі СА1 гіпокампа зростає площа p53-ІРМ в групі тварин із ДКІР у 2 рази і в групі з діабетом - в 1,8 раза порівняно з контролем. У цій же структурі ішемія-реперфузія мозку на тлі ЦД викликала зростання даного показника в 3 рази порівняно з групою діабетичних тварин.

Таблиця 1

Вплив ішемії-реперфузії на експресію білка Hif-1 α в корі лобової частки самців-шурів за умов цукрового діабету (M \pm m)

Група спостереження	Площа Hif-1 α -ІРМ на 10 000 мкм ²
Контроль	14,7 \pm 3,1
Ішемія-реперфузія	41,8 \pm 10,6 p ₁ <0,05
Діабет	62,9 \pm 13,1 p ₁ <0,001
Діабет та ішемія-реперфузія	183 \pm 34,0 p ₂ <0,001

Примітка (в даній та наступних таблицях). p₁ – вірогідність різниці порівняно з контролем, p₂ – вірогідність різниці порівняно з діабетом

Таблиця 2

Вплив ішемії-реперфузії на експресію білка p53 у корі лобової частки самців-шурів за умов цукрового діабету (M \pm m)

Група спостереження	Сумарна кількість p53 ⁺ -клітин на 1 мм ²	Кількість p53 ⁺ -нейроцитів на 1 мм ²	Кількість p53 ⁺ -гліоцитів на 1 мм ²
Контроль	76,7 \pm 5,5	19,9 \pm 1,9	56,8 \pm 4,6
Ішемія-реперфузія	74,6 \pm 6,2	16,0 \pm 1,7	58,6 \pm 5,1
Діабет	66,9 \pm 6,0	18,0 \pm 2,1	49,0 \pm 5,1
Діабет та ішемія-реперфузія	68,9 \pm 6,9	17,8 \pm 1,9	51,1 \pm 5,6

Таблиця 3

Вплив ішемії-реперфузії на експресію білка Vcl-2 в корі лобової частки самців-шурів за умов цукрового діабету (M \pm m)

Група спостереження	Сумарна кількість Vcl-2 ⁺ -клітин на 1 мм ²	Кількість Vcl-2 ⁺ -нейроцитів на 1 мм ²	Кількість Vcl-2 ⁺ -гліоцитів на 1 мм ²
Контроль	38,4 \pm 4,0	20,0 \pm 4,9	18,4 \pm 5,9
Ішемія-реперфузія	52,7 \pm 4,2	31,8 \pm 1,7 p ₁ <0,01	20,9 \pm 3,8
Діабет	57,6 \pm 6,8	21,5 \pm 3,1	36,1 \pm 6,2
Діабет та ішемія-реперфузія	78,9 \pm 5,1 p ₂ <0,05	40,1 \pm 2,6 p ₂ <0,001	38,7 \pm 4,6

Таблиця 4

Вплив ішемії-реперфузії на експресію білків Hif-1 α , p53 і Vcl-2 в гіпокампі самців-шурів за умов цукрового діабету (M \pm m)

Поле гіпокампа	Група спостереження	Площа Hif-1 α -ІРМ на 10 000 мкм ²	Площа p53-ІРМ на 10 000 мкм ²	Площа Vcl-2-ІРМ на 10 000 мкм ²
СА1	Контроль	11,4 \pm 2,5	220 \pm 46	287 \pm 48
	Ішемія-реперфузія	10,9 \pm 2,3	435 \pm 75 p ₁ <0,05	402 \pm 51
	Діабет	13,6 \pm 3,1	398 \pm 74 p ₁ <0,05	278 \pm 60
	Діабет та ішемія-реперфузія	10,9 \pm 2,0	1192 \pm 83 p ₂ <0,001	567 \pm 64 p ₂ <0,001
СА2	Контроль	7,56 \pm 0,71	625 \pm 87	433 \pm 53
	Ішемія-реперфузія	11,9 \pm 2,0	800 \pm 90	707 \pm 52 p ₁ <0,001
	Діабет	11,1 \pm 1,7	700 \pm 71	736 \pm 15 p ₁ <0,001
	Діабет та ішемія-реперфузія	7,55 \pm 1,39	732 \pm 80	761 \pm 61
СА3	Контроль	9,25 \pm 1,39	336 \pm 63	466 \pm 55
	Ішемія-реперфузія	15,5 \pm 3,8	587 \pm 64 p ₁ <0,01	338 \pm 53
	Діабет	12,7 \pm 3,2	663 \pm 77 p ₁ <0,001	746 \pm 24 p ₁ <0,001
	Діабет та ішемія-реперфузія	13,9 \pm 4,9	955 \pm 167 p ₂ <0,05	508 \pm 58 p ₂ <0,001

Експресія білка p53 у полі СА2 не змінилася в усіх групах.

Площа ІРМ за p53 у полі СА3 групи з ДКІР зросла в 1,7 раза по відношенню до контрольної групи. Діабет спричинив зростання p53-ІРМ у 2 рази. Поєднана дія ішемії-реперфузії та ЦД збільшила площу p53-ІРМ в 1,4 раза порівняно з групою щурів із тримісячним діабетом.

Експресія Bcl-2 у гіпокампі зазнала таких змін. У полі СА1 у щурів із ДКІР і ЦД порівняно з цукровим діабетом без ішемії-реперфузії рівень ІРМ за Bcl-2 збільшився у 2 рази.

У полі СА2 цей показник порівняно з контролем зріс у групі контрольних тварин з ішемією-реперфузією та в групі щурів із ЦД в 1,6 та 1,7 раза відповідно.

Площа ІРМ за Bcl-2 в полі СА3 збільшилася в діабетичних тварин у 1,6 раза відносно контрольних тварин. ДКІР на тлі цукрового діабету порівняно з групою діабету викликала зниження Bcl-2-ІРМ у півтора раза.

Висновки

1. За дослідженими показниками реакція геному в корі лобової частки та гіпокампі на поєднану дію двобічної каротидної ішемії-реперфузії і цукрового діабету відрізняється.

2. У корі лобової частки ішемія-реперфузія, на тлі цукрового діабету, спричиняє посилення експресії білків Hif-1 α та Bcl-2, але не p53.

3. У гіпокампі, за цих же умов експерименту, немає змін в експресії білка Hif-1 α , з одночасним посиленням продукції білків p53 і Bcl-2 (за винятком поля СА3, де експресія Bcl-2 знижується).

Перспективи подальших досліджень

Результати свідчать про доцільність досліджень цих же показників у динаміці, а також вивчення продуктів експресії інших генів, що реагують на системні зміни метаболізму та ішемію.

Література. 1. *Белки семейства Bcl-2 и механизмы ускорения и торможения прогрессии опухолей in vivo* / Н.А. Дьякова, В.А. Матвеева, Л.М. Капкина [и др.] // Вестн. РАМН. – 2007. – №11. – С.37-41. 2. *Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга* / Е.И.Гусев, В.И.Скворцова. – М.: Медицина, 2001. – 328 с. 3. *Чумаков П. М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме* / П. М. Чумаков // Успехи биол. химии. – 2007. – Т. 47, № 1. – С. 3-52. 4. *Dynamic changes of apoptosis and expression of Bcl-2 family members in the posthatch hippocampus of Bengalese finches* / L. Zeng, X. Lu, Sh. Zeng

[et al.] // Brain Res. – 2006. – Vol.1107, №1. – P.58-69. 5. *HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia* / D.M.Stroka, T.Burkhardt, I.Desbaillets // Faseb J. – 2001. – Vol.15, №13. – P.2445-2453. 6. *Joslin's Diabetes Mellitus* / [C.R. Kahn, C.W.Gordon, L.K.George et al.]. – [14th ed.]. – Philadelphia.: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – 1224 p. 7. *Maxwell P.H. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator* / P.H. Maxwell // Exp. Physiol. – 2005. – Vol.90, №6. – P.791-197. 8. *Royds J. p53 and disease: when the guardian angel fails* / J. Royds, B. Jacopetta // Cell Death. Differ. – 2006. – Vol. 13. – P.1017-1026. 9. *Rozan L. p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution* / L. Rozan, W. El-Deiry // Cell Death Differ. – 2007. – Vol.14. – P.3-9. 10. *Up-regulation of HIF-1 α and VEGF expression by elevated glucose concentration and hypoxia in cultured human retinal pigment epithelial cells* / X. Qing, Sh. Zeng, Sh. Ling [et al.] // J. Huazhong Univ. Sci. and Technol. Med. Sci. – 2006. – Vol.26, №4. – P.463-465. 11. *Wilkinson L. Neurology* / L.Wilkinson, G.Lennox // Malden – Oxford – Carlton: Blackwell Publishing, 2005. – 278 p.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ HIF-1 α , P53 И BCL-2 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ДВУСТОРОННЕЙ КАРОТИДНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА У САМЦОВ КРЫС

С.С. Ткачук, А.М. Леньков

Резюме. Исследовано влияние двусторонней каротидной ишемии-реперфузии головного мозга на уровни экспрессии белков Hif-1 α , p53 и Bcl-2 в коре лобной доли и разных полях гиппокампа при стрептозототин-индуцированном сахарном диабете у самцов крыс. Ишемия-реперфузия на фоне сахарного диабета повышает экспрессию белков Hif-1 α и Bcl-2 в коре лобной доли. В гиппокампе, в этих же условиях, возрастает экспрессия белков p53 и Bcl-2.

Ключевые слова: каротидная ишемия-реперфузия, головной мозг, сахарный диабет, Hif-1 α , p53, Bcl-2.

EXPRESSION OF HIF-1 α , P53 AND BCL-2 PROTEINS IN THE BRAIN UNDER UNDER THE CONDITIONS OF BILATERAL CAROTID ISCHEMIA-REPERFUSION IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS IN MALE RATS

S. S. Tkachuk, A. M. Lenkov

Abstract. The influence of bilateral carotid ischemia-reperfusion on the indices of Hif-1 α , p53 and Bcl-2 proteins expression in the forebrain cortex and different hippocampal zones in male rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus has been investigated. The ischemia-reperfusion against a background of diabetes mellitus increases expression of Hif-1 α and Bcl-2 proteins in the forebrain cortex. In the hippocampus under the same conditions expression of p53 and Bcl-2 proteins increases.

Key words: carotid ischemia-reperfusion, brain, diabetes mellitus, Hif-1 α , p53, Bcl-2.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2010. - Vol.9, №2 (32). - P.111-113.

Надійшла до редакції 25.05.2010
Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький
© С. С. Ткачук, О. М. Леньков, 2010