

УДК 616.379-008.64:616.831-005.1]: 616.155.32-019

О. В. Ткачук

Буковинський державний медичний  
університет, м. ЧернівціСТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЇ VCL-2+  
ЛІМФОЦИТІВ У ТИМУСІ ЩУРІВ ЗІ  
СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ  
ДІАБЕТОМ, УСКЛАДНЕНИМ ІШЕМІЧНО-  
РЕПЕРFUЗІЙНИМ ПОШКОДЖЕННЯМ  
ГОЛОВНОГО МОЗКУ**Ключові слова:** цукровий діабет,  
ішемія-реперфузія головного мозку,  
тимус, апоптоз, білок Vcl-2.**Резюме.** Досліджено вплив неповної глобальної ішемії мозку на структуру популяції Vcl-2+ -лімфоцитів у тимусі щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом. Встановлено, що ішемія-реперфузія головного мозку при діабеті значно підвищує активність протиапоптотичного гена Vcl-2 у мозковій зоні тимуса та знижує – у кірковій, про що свідчать відповідні зміни щільності субпопуляцій Vcl-2-імунореактивних тимоцитів.**Вступ**

Протягом останніх років відкрита та вивчена роль багатьох індукторів та репресорів апоптозу в різних тканинах організму. Встановлено, що в клітинах імунної системи найчастіше реалізуються три форми апоптозу – та, яка є наслідком дефіциту ростових факторів, індукована глюкокортикоїдами й іншими агентами зі схожим механізмом дії, і так званий «активаційний апоптоз», який є наслідком дисбалансу активаційних сигналів та запускає програму загибелі клітин при їх активації [7, 16]. Дослідження патогенезу аутоімунних захворювань нерозривно пов'язане з вивченням молекулярних механізмів апоптозу в тимусі, оскільки саме цей орган лімфоїдної системи є визначальним щодо нормального перебігу або порушення процесів аутолерантності [3, 11]. Для реалізації нормальної програми процесів апоптозу в тимусі надзвичайно важливою є збалансована діяльність сімейства bcl-2-генів, до складу якого входять як про-, так і антиапоптотичні гени [14-16]. Відомі своїми антиапоптотичними ефектами гени Vcl-2, Vcl-xL, ced-9, BHRF1, LMW5-HL. Експресія продукта гена bcl-2 – білка Vcl-2 – у тимусі за умов ранніх термінів розвитку цукрового діабету добре вивчена [5, 10]. Однак вплив на ці процеси довготривалого діабету, поєднаного з ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку, майже недосліджений.

Відомо, що цукровий діабет є фоновим захворюванням, на тлі якого пришвидшується прогресування та має місце більш тяжкий перебіг багатьох патологічних станів, серед яких чільне місце належить судинним розладам, зокрема, ішемії головного мозку [12, 13]. Крім того, ішемія мозку

ку різного ступеня тяжкості часто виникає в цієї категорії хворих унаслідок коматозних станів різного генезу, енергодефіциту в ЦНС. Ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку, як і діабет, відносять до станів, у природі яких наявні аутоімунні компоненти [2, 4, 9]. Тому механізми порушення аутолерантності при поєднанні цих захворювань є актуальною проблемою, вирішення якої дозволить оптимізувати шляхи їх корекції або запобігання.

**Мета дослідження**

Вивчити структуру популяції Vcl-2+ -лімфоцитів у тимусі щурів при поєднаному впливі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету та ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку.

**Матеріал і методи**

У білих нелінійних самців щурів контрольної групи та з чотиримісячним цукровим діабетом відтворювали двобічну каротидну ішемію тривалістю 20 хв із наступною реперфузією [8]. Цукровий діабет моделювали шляхом однократного внутрішньочеревинного уведення двомісячним щурам стрептозотоцину (Sigma, США, 60 мг/кг маси тіла) [10, 13, 15]. У дослід брали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Для контрольних досліджень у частини інтактних щурів і щурів із цукровим діабетом виділяли сонні артерії, подразнювали їх стінку без припинення кровотоку. Тварин виводили з експерименту на 12 добу декапітацією під наркозом. Експресію Vcl-2 виявляли методом непрямой імунофлуоресценції у ви-

падково відібраних серійних зрізах тимуса товщиною 5 мкм. Для цього їх депарафінували в кислоти, проводили регідратацію в нисхідних концентраціях етанолу, тричі проводили 10-хвилинне відмивання в 0,1 М фосфатному буфері (рН =7,4). Після інкубації протягом 18 год у вологій камері при  $t=4^{\circ}\text{C}$  із первинними мишачими моноклональними антитілами до Vcl-2 щура (mouse IgG1 isotype) виробництва Sigma Chemical (США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері проводили інкубацію зрізів протягом 60 хв ( $t=37^{\circ}\text{C}$ ) зі вторинними антитілами (козячі антитіла до повної молекули IgG миши, кон'юговані з FITC, Sigma Chemical, США) у розведенні 1:64. Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину та фосфатного буфера (9:1) для наступної люмінесцентної мікроскопії.

Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити кіркової та мозкової зон тимуса ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [1,6].

Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних виборок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

### Обговорення результатів дослідження

Аналіз структури популяції Vcl-2-імунореактивних тимоцитів в кірковій зоні залози контрольних щурів показав, що найбільша частка належить малим лімфоцитам (табл.). Це ж стосується й відсоткового розподілу даних клітин. У кірковій зоні тимуса контрольних тварин ішемія-реперфузія головного мозку знизила сумарну щільність Vcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів в 1,40 раза за рахунок досить рівномірного зниження всіх субпопуляцій: лімфобластів, великих, середніх та малих Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцитів в 1,99, 1,56, 1,47 та 1,32 раза відповідно. Відбулася також деяка перебудова відсоткового співвідношення Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцитів: зниження в 1,59 раза відсотка лімфобластів та зростання в 1,1 раза відсотка малих тимоцитів.

Характерно, що у тварин із цукровим діабетом загальна щільність та щільність усіх субпопуляцій Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцитів була достовірно вищою, ніж у контролі (загальна – у 2,88 раза, щільність лімфобластів, великих, середніх та малих – у 2,10, 2,20, 2,20, 3,47 раза відповідно). На нашу думку, таке посилення антиапоптотичного потенціалу тимоцитів може свідчити про погіршення процесів їх селекції і супроводжуватися активацією аутоімунних процесів. Достовірний характер за умов діабету носила й перебудова відсоткового співвідношення тимоцитів – відсоток Vcl-2<sup>+</sup>-лімфобластів,

Таблиця

**Щільність Vcl-2<sup>+</sup>-клітин у загруднинній залозі щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)**

Група спостереження	Сумарна щільність Vcl-2 <sup>+</sup> -клітин	Vcl-2 <sup>+</sup> -лімфобласти	Vcl-2 <sup>+</sup> -великі лімфоцити	Vcl-2 <sup>+</sup> -середні лімфоцити	Vcl-2 <sup>+</sup> -мали лімфоцити
Кіркова зона					
Контроль	59,2±3,87	<u>4,00±0,44</u> 9,17±0,97	<u>6,55±0,59</u> 12,2±0,89	<u>16,0±1,23</u> 26,4±1,14	<u>32,3±2,35</u> 51,7±1,40
Ішемія-реперфузія	41,5±2,45*	<u>2,01±0,23*</u> 5,75±0,66*	<u>4,16±0,36*</u> 11,4±0,93	<u>10,9±0,78*</u> 26,8±1,34	<u>24,4±1,57*</u> 55,8±1,04*
Діабет	170±8,02*	<u>8,24±0,79*</u> 6,15±0,60*	<u>14,3±1,14*</u> 9,18±0,69*	<u>35,3±2,15*</u> 22,7±1,05*	<u>112±5,91*</u> 61,6±1,17*
Діабет та ішемія-реперфузія	54,9±3,84 <sup>#</sup>	<u>3,02±0,26<sup>#</sup></u> 6,96±0,85	<u>4,88±0,53<sup>#</sup></u> 9,37±0,94	<u>11,7±0,98<sup>#</sup></u> 22,6±1,36 <sup>^</sup>	<u>35,1±2,65<sup>#</sup></u> 60,8±1,60 <sup>^</sup>
Медулярна зона					
Контроль	36,1±3,28	<u>1,45±0,37</u> 4,54±1,07	<u>3,70±0,68</u> 11,6±1,98	<u>10,0±0,98</u> 27,9±2,38	<u>21,0±1,75</u> 55,3±2,38
Ішемія-реперфузія	30,1±2,94	<u>0,99±0,21</u> 5,01±1,40	<u>3,73±0,49</u> 15,0±1,75	<u>7,10±0,78*</u> 22,9±1,84*	<u>18,3±1,97</u> 57,1±2,26
Діабет	34,6±4,14	<u>0,48±0,17*</u> 1,77±0,65*	<u>2,71±0,46</u> 9,92±1,40	<u>9,20±1,15</u> 29,4±2,28	<u>22,2±2,18</u> 58,9±1,60
Діабет та ішемія-реперфузія	49,0±4,83 <sup>#</sup>	<u>2,73±0,46<sup>#</sup></u> 6,74 ±1,14 <sup>#</sup>	<u>4,24±0,59<sup>#</sup></u> 8,59±0,98 <sup>^</sup>	<u>9,28±1,15</u> 20,5±1,90 <sup>#</sup>	<u>32,7±3,40<sup>#</sup></u> 64,2±2,04 <sup>#</sup>

**Примітка.** у чисельнику - щільність Vcl-2<sup>+</sup>-клітин на 1 мм<sup>2</sup> тимуса; у знаменнику – відсоткова частка окремих класів Vcl-2<sup>+</sup>-клітин; вірогідність змін щодо показників – \* – у контрольних тварин; ^ – у контрольних тварин з ішемією-реперфузією головного мозку; # - у тварин із цукровим діабетом

великих та середніх тимоцитів знизився в 1,5, 1,33, 1,2 раза, а відсоток малих – зріс в 1,2 раза.

Як і в контрольних тварин, при діабеті ішемія-реперфузія головного мозку знижувала сумарну щільність Bcl-2<sup>+</sup>-лімфоцитів у кірковій зоні залози в 3,1 раза за рахунок лімфобластів, великих, середніх та малих тимоцитів (у 2,73, 2,93, 3,0 та 3,2 раза відповідно). Відсоткове співвідношення за цих умов достовірних змін не зазнало. Отже, у кірковій зоні тимуса зміни експресії протиапоптотичного білка Bcl-2 при ішемії-реперфузії головного мозку більш вагомі в щурів із цукровим діабетом порівняно з контрольними.

Що стосується медулярної зони тимуса, то в ній на ішемію-реперфузію в контрольних щурів відреагували (зниженням в 1,41 раза) лише Bcl-2<sup>+</sup>-середні лімфоцити, що на сумарну кількість достовірно не вплинуло. Знизився також їх відсоток. Не вплинув суттєво на щільність Bcl-2<sup>+</sup>-лімфоцитів і цукровий діабет – за цих умов достовірно знизилася лише щільність та відсоток Bcl-2<sup>+</sup>-лімфобластів у 2,0 та 2,56 раза відповідно). Однак ішемія мозку у тварин цієї групи достовірно підвищила як сумарну щільність Bcl-2-імунореактивних тимоцитів (в 1,42 раза), так і лімфобластів, великих та малих тимоцитів у 5,68, 1,56, 1,47 раза. Виняток становили середні лімфоцити, щільність яких змін не зазнала. Ішемія-реперфузія мозку дещо змінила й відсотковий розподіл Bcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів – у 3,8 раза зріс відсоток лімфобластів та в 1,1 раза – відсоток малих тимоцитів, у той час як відсоток середніх знизився в 1,43 раза. Отже, якщо в кірковій зоні зміни структури Bcl-2-імунореактивних тимоцитів при ішемії-реперфузії головного мозку та діабеті більш вагомі, ніж у контрольних щурів, то в мозковій зоні реакція на ішемічне втручання притаманна винятково тваринам із цукровим діабетом.

Отримані результати свідчать, що у тварин із чотиримісячним цукровим діабетом ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку значно підвищує активність протиапоптотичного гена Bcl-2 в мозковій зоні тимуса та пригнічує – у кірковій.

## Висновки

1. У кірковій зоні тимуса цукровий діабет знижує сумарну щільність Bcl-2-імунореактивних тимоцитів за рахунок усіх субпопуляцій Bcl-2<sup>+</sup>-позитивних клітин, а в мозковій зоні залози – практично не впливає на ці показники.

2. Ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку знижує щільність Bcl-2<sup>+</sup>-позитивних лімфоцитів у кірковій зоні тимуса контрольних щурів та ще більшою мірою – у тварин із цукро-

вим діабетом за рахунок усіх досліджених субпопуляцій. У мозковій зоні залози контрольних тварин ішемія-реперфузія головного мозку призводить до зниження лише щільності Bcl-2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів, а при поєднанні ішемії мозку та цукрового діабету відбувається підвищення щільності всіх субпопуляцій Bcl-2-імунореактивних тимоцитів, за винятком середніх.

## Перспективи подальших досліджень

Для остаточного заключення про стан про- та антиапоптотичного потенціалу в тимусі при поєднанні діабету та ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку необхідним є порівняння активності гена Bcl-2 з активністю проапоптотичних генів, зокрема, гена p53.

**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. Аутоиммунные механизмы при ишемии / Н.Константинова, В.И.Скворцова, И.Еремін и [др.] // Аллергол. и иммунология. - 2005. - Т.6, №2. - С. 147-149. 3. Иммунологические особенности органоспецифических аутоиммунных эндокринных заболеваний / Е.А.Селиванов, Т.В.Глазнова, Л.Н.Бубнова, В.И.Мазуров // Мед. Акад. Журн. - 2008. - Т.8, №1. - С. 237-242. 4. Интерлейкины и хемокины при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном диабетом / А.С.Бояджян, Э.А.Аракуелова, В.А.Айвазян, Л.А.Манукян // Цитокины и воспаление. - 2008. - Т. 7, № 1. - С. 40-43. 5. Камышный А.М., Колесник Ю.М., Абрамов А.В. Участие индуцибельной NO-синтазы и белка Bcl-2 в регуляции апоптоза тимоцитов у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом / А.М.Камышный, Ю.М.Колесник, А.В.Абрамов // Патология. - 2006. - Т3, №3. - С.23-26. 6. Любомирская В.А. Динамика лимфоидной популяции тимуса при экспериментальном сахарном диабете у крыс // Укр. мед. альманах. - 2002. - №3. - С. 80-82. 7. Романова Е.В., Кузьмичева Л.В., Матюшкин А.П. Влияние содержания катехоламинов на апоптоз лимфоцитов периферической крови при раке легкого / Е.В.Романова, Л.В.Кузьмичева, А.П.Матюшкин // Морфологические ведомости. - 2009. - №1-2. - С. 143-144. 8. 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. 9. Цимбалюк В.И. Роль некоторых нейроиммунных и сосудистых факторов при ишемических повреждениях головного мозга / В.И.Цимбалюк, М.С.Бровченко // Укр. мед. часопис. - 2005. - № 4(48). - С. 25-28. 10. Характеристика экспрессии белка Bcl-2 в тимусе у крыс с экспериментальным сахарным диабетом / А.М.Камышный, Ю.М.Колесник, А.В.Абрамов [та ін.] // Клін. анатомія та оперативна хірургія. - 2007. - №1. - С.68-71. 11. Geenen V., Brilot F. 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. 12. 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. 13. Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes / V.Geenen, F.Brilot, C.Louis [et al.] // Rev. Med. Liege. - 2005. - Vol. 60, N 5-6. - P. 291-295. 14. Hughes P. Role of Bim and other Bcl-2 family members in autoimmune and degenerative diseases / P. Hughes, P. Bouillet, A. Strasser // Curr. Dir. Autoimmun. - 2006. - Vol. 9. - P. 74-94. 15. Marsden V. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more / V. Marsden, Strasser A // Annu. Rev. Immunol. - 2003. - Vol. 21. - P. 71-105. 16. The Bcl-2- regulated apoptotic pathway / S. Willis, C. Day, M. Hinds, D. Huang // J. Cell Sci. - 2003. - Vol. 116. - P. 4053-4056.

**СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЇ BCL-2+  
ЛИМФОЦИТОВ В ТИМУСЕ КРЫС СО  
СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦІРОВАННИМ  
ДИАБЕТОМ, ОСЛОЖНЕНИМ ИШЕМИЧЕСКИ-  
РЕПЕРФУЗИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

*А.В. Ткачук*

**Резюме.** Исследовано влияние неполной глобальной ишемии головного мозга на структуру популяции Bcl-2<sup>+</sup>-лимфоцитов в тимусе крыс со стрептозоточин-индуцированным сахарным диабетом. Показано, что ишемия-реперфузия головного мозга при диабете значительно повышает активность антиапоптотического гена Bcl-2 в мозговой зоне тимуса, и снижает – в корковой, о чем свидетельствуют соответствующие изменения плотности субпопуляций Bcl-2-иммунореактивных тимоцитов.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, ишемия-реперфузия головного мозга, тимус, апоптоз, белок Bcl-2.

**THE STRUCTURE OF THE POPULATION OF BCL-  
2+LYMPHOCYTES IN THE THYMUS OF RATS  
WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES  
COMPLICATED BY AN ISCHEMIC-REPERFUSION  
LESION OF THE BRAIN**

*O.V. Tkachuk*

**Abstract.** The effect of incomplete global brain ischemia on the structure of the population of Bcl-2<sup>+</sup>-lymphocytes in the thymus of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus has been studied. Ischemic-reperfusion of the brain in case of diabetes has been found to increase considerably the activity of the antiapoptotic gene Bcl-2 in the cerebral zone of the thymus and decrease – in the cortical zone, the corresponding changes of the density of subpopulations of the Bcl-2<sup>+</sup>-immunoreactive thymocytes being indicative of it.

**Key words:** diabetes mellitus, cerebral ischemia-reperfusion, thymus, apoptosis, Bcl-2<sup>+</sup>-protein.

**Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)**

*Clin. and experim. pathol.* - 2010. - Vol.9, №2 (32). - P.107-110.

*Надійшла до редакції 25.05.2010*

*Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький*

*© О. В. Ткачук, 2010*