

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

О.В. Ткачук

СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЇ PCNA⁺- ЛІМФОЦИТІВ У ТИМУСІ ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ, УСКЛАДНЕНИМ ІШЕМІЧНО-РЕПЕРFUЗИЙНИМ ПОШКОДЖЕННЯМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних щурів посилює проліферативні процеси в тимоцитах кіркової, та ще більш суттєво – мозкової зони. У щурів із цукровим діабетом сумарну щільність PCNA⁺- тимоцитів ішемія-реперфузія мозку або знижує (кіркова зона), або не впливає на неї (мозкова зона).

Вступ. Порушення центральної імунотолерантності є характерною рисою цукрового діабету та низки захворювань, пов'язаних із пошкодженням нервової тканини, які часто є ускладненням діабету [1,2, 11]. Зокрема, це ішемія-реперфузія головного мозку, яка за умов цукрового діабету виникає не лише внаслідок гострих порушень церебрального кровообігу, але і як компонент гіпо-, гіперглікемічних та кетоацидотичних ком [6]. Вона супроводжується підвищенням проникності гематоенцефалічного бар'єра, що призводить до посиленого виходу зруйнованих білків нервової тканини й формування відповідної аутоімунної відповіді [3]. Зрозуміло, що поєднання таких потужних аутоімунних процесів, як діабет та ішемічно-реперфузійне ушкодження нервової тканини призводить до взаємного обтяження цих патологічних станів, тому вивчення механізмів їх формування є необхідним для відповідної патогенетичної терапії.

Провідна роль у розвитку аутоімунних процесів належить тимусу [8,9]. Аутоімунний цукровий діабет 1-го типу пов'язаний зі змінами Т-клітинної активності. Встановлено, що циркулююча РНК, виділена з крові хворих на діабет 1-го типу, впливає на проліферацію, апоптоз та запальний потенціал тимоцитів щура [7]. Однак проліферативні процеси в тимусі за умов поєднання діабету з ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку залишаються недослідженими. Одним із маркерів активності мітотичних процесів у клітині є ядерний антиген клітинної проліферації PCNA [10,12,13], дослідження якого ми провели в тимоцитах щурів після моделювання цукрового діабету та двобічної каротидної ішемії-реперфузії.

Мета дослідження. Вивчити вплив ішемії-реперфузії головного мозку на структуру PCNA⁺ клітин лімфоїдної популяції тимуса в контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом.

Матеріал і методи. Для досягнення мети вивчали щільність розташування PCNA⁺- клітин у загруднинній залозі шестимісячних білих нелінійних щурів контрольної групи та тварин аналогічного віку з чотиримісячним цукровим діабетом.

Однак в обох структурно-функціональних відділах залози тварин із поєднаною патологією мітотична активність у незрілих тимоцитах зростає, а у функціонально активних зрілих – знижується.

Ключові слова: цукровий діабет, ішемія-реперфузія головного мозку, PCNA⁺, тимоцити.

том після ішемії мозку з подальшою його реперфузією. Для відтворення цукрового діабету 1-го типу двомісячним щурам однократно внутрішньоочеревинно вводили стрептозотин (Sigma, США, 60 мг/кг маси тіла) [4]. У дослід брали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Неповну глобальну ішемію мозку моделювали 20-хвилинним кліпсуванням сонних артерій [5], після чого кровотік по даних судинах відновлювали. На 12-у добу після моделювання ішемії-реперфузії тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під каліпсоловим наркозом. Тимус 18 год фіксували в розчині Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін, готували серійні зрізи товщиною 5 мкм. Для вивчення проліферативної активності субпопуляцій тимоцитів використано імуноцитофлуоресцентний метод визначення ядерного антигена клітинної проліферації PCNA. Серійні зрізи з різних ділянок тимуса депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (96%, 90%, 70%, 50%) і тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН =7,4). Дослідження проведено у випадково відібраних зрізах двох морфологічних зон тимуса – кіркової та мозкової.

PCNA виявляли непрямим імунофлуоресцентним методом, для чого регідровані гістологічні зрізи тимуса інкубували з первинними антитілами – мишачими IgG2a до PCNA щура, виробництва Sigma Chemical (США), протягом 18 год у вологій камері при T=4° С. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв (T=37° С) зі вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використано антитіла кроля до повної молекули IgG миші, кон'юговані з FITC (Sigma Chemical, США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину і фосфатного буфера (9:1) для наступної люмінесцентної мікроскопії.

Для опрацювання зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [4].

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

Результати дослідження та їх обговорення. У контрольних щурів ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку підвищує сумарну щільність розташування PCNA⁺ клітин (таблиця). Вивчення структури популяції PCNA⁺-timoцитів показало, що це зростання відбувається за рахунок середніх лімфоцитів, хоча недостовірне зростання відмічалось в усіх вивчених класах клітин. Дане втручання не вплинуло на відсоткове співвідношення субпопуляції PCNA⁺-timoцитів.

Чотиримісячний цукровий діабет також підвищує сумарну щільність PCNA⁺- клітин у кірковій зоні тимуса, однак таке сумарне підвищення відбулося суто за рахунок малих тимоцитів, у той час як щільність усіх інших класів тимоцитів достовірно знижувалася. Отже, посилення проліферації тимоцитів у тварин із діабетом має місце винятково за рахунок найбільш зрілих малих клітин. Характерно, що ступінь пригнічення проліферативних процесів в інших класах тимоцитів зменшується зі зростанням їх зрілості.

Зміни відсоткового співвідношення різних класів тимоцитів, у цілому, повторюють зміни їх щільності.

Таблиця

Щільність PCNA⁺- клітин у загруднинній залозі щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)

Група спостереження	Сумарна щільність PCNA ⁺ -клітин	PCNA ⁺ -лімфо-бласти	PCNA ⁺ -великі лімфоцити	PCNA ⁺ -середні лімфоцити	PCNA ⁺ -малі лімфоцити
Кіркова зона					
Контроль	1078±19	$\frac{9,56 \pm 1,56}{1,41 \pm 0,27}$	$\frac{27,30 \pm 1,73}{3,60 \pm 0,40}$	$\frac{226,5 \pm 9,6}{23,41 \pm 1,10}$	$\frac{812,5 \pm 23,5}{71,40 \pm 1,31}$
Ішемія-реперфузія	1167±15 ²	$\frac{11,1 \pm 1,33}{1,00 \pm 0,12}$	$\frac{32,1 \pm 2,05}{2,98 \pm 0,23}$	$\frac{278 \pm 7,50^2}{23,8 \pm 0,61}$	$\frac{842 \pm 14,0}{71,88 \pm 0,67}$
Діабет	1150±18 ¹	$\frac{3,16 \pm 0,54^1}{0,64 \pm 0,21^1}$	$\frac{13,20 \pm 1,87^2}{1,50 \pm 0,24^2}$	$\frac{161,8 \pm 6,49^3}{15,40 \pm 0,69^3}$	$\frac{996,0 \pm 20,3^2}{82,0 \pm 0,80^3}$
Діабет та ішемія-реперфузія	1079±13 ^{II}	$\frac{12,70 \pm 1,73^{III}}{1,28 \pm 0,18^1}$	$\frac{42,48 \pm 3,10^{III}}{4,07 \pm 0,31^{III}}$	$\frac{326,4 \pm 8,96^{III}}{30,27 \pm 0,77^{III}}$	$\frac{696,1 \pm 12,8^{III}}{64,29 \pm 0,82^{III}}$
Медулярна зона					
Контроль	874,4±25,4	$\frac{4,48 \pm 1,61}{0,63 \pm 0,22}$	$\frac{19,93 \pm 3,24}{2,41 \pm 0,40}$	$\frac{207,8 \pm 10,4}{25,84 \pm 1,37}$	$\frac{637,2 \pm 23,4}{70,67 \pm 1,38}$
Ішемія-реперфузія	1018±16 ³	$\frac{18,90 \pm 1,89^3}{2,07 \pm 0,22^2}$	$\frac{44,76 \pm 2,94^3}{4,58 \pm 0,31^2}$	$\frac{338,9 \pm 8,28^3}{34,05 \pm 0,78^3}$	$\frac{609,6 \pm 14,6}{58,69 \pm 0,80^3}$
Діабет	797,0±22,4 ¹	$\frac{12,6 \pm 2,47^1}{1,91 \pm 0,39^1}$	$\frac{28,93 \pm 3,34^1}{4,50 \pm 0,64^1}$	$\frac{191,3 \pm 9,78}{25,41 \pm 1,25}$	$\frac{563,3 \pm 24,2^1}{68,07 \pm 1,45}$
Діабет та ішемія-реперфузія	804,8±22,2	$\frac{15,36 \pm 2,66^{III}}{2,61 \pm 0,56}$	$\frac{53,30 \pm 3,86^{II}}{6,99 \pm 0,67^{II}}$	$\frac{269,4 \pm 10,4^{III}}{34,16 \pm 1,12^{III}}$	$\frac{462,9 \pm 18,4^{II}}{55,82 \pm 1,31^{III}}$

Примітка. У чисельнику – щільність PCNA⁺ клітин на 1 мм² загруднинної залози; у знаменнику – відсоткова частка окремих класів PCNA⁺ клітин; вірогідність змін щодо показників у контрольних тварин: ¹ – p<0,01; ² – p<0,005; ³ – p<0,001; у тварин із цукровим діабетом ¹ – p<0,01; ^{II} – p<0,005; ^{III} – p<0,001

На відміну від контрольних тварин, у щурів із діабетом ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку спричинило зниження сумарної щільності розташування PCNA⁺ лімфоцитів у кірковій зоні тимуса. Аналіз змін даного показника в різних класах тимоцитів показав, що вони відбулися, знову ж таки, за рахунок малих клітин, у той час як щільність всіх інших PCNA⁺ клітин зростала. Отже, зниження проліферації відбувається в найбільш функціонально активних зрілих тимоцитах, у той час як проліферація незрілих, малоактивних форм зростає. У подальшому вони зазнають апоптотичних змін, внаслідок чого як сумарна щільність проліферуючих клітин, так і, зокрема, зрілих форм, знижується. Зміни відсоткового співвідношення даних класів

клітин у тварин цієї експериментальної групи мають таку ж закономірність, що й зміни щільності.

У мозковій зоні тимуса зміни щільності PCNA⁺-лімфоцитів після ішемії-реперфузії головного мозку носять інший характер. Як і в кірковій зоні, сумарна щільність розташування PCNA⁺-лімфоцитів зростає, однак це зростання відбувається шляхом рівномірного підвищення щільності всіх клітин, за винятком малих. Щільність останніх залишається незмінною. Що стосується відсоткового співвідношення, то можна відмітити зростання частки всіх клітин, за винятком малих, відсоток яких знижується.

Характерно, що в мозковій зоні тимуса цукровий діабет спричиняє зміни, протилежні тим,

що мали місце в кірковій – сумарна щільність PCNA⁺-лімфоцитів знижується за рахунок малих тимоцитів, а кількість клітин усіх інших класів – зростає. У тварин даної серії зростає відсоток лімфобластів та великих тимоцитів, а частка середніх та малих залишається незмінною.

У мозковій зоні залози тварин із діабетом ішемія-реперфузія мозку не змінює сумарної щільності розташування PCNA⁺-лімфоцитів, однак у межах окремих класів виявлено суттєві зміни. Вони полягають у достовірному зростанні щільності лімфобластів, великих та середніх PCNA⁺-тимоцитів, яке нівелюється суттєвим зниженням щільності малих клітин. Зміни відсоткового співвідношення мають практично таке ж спрямування, як і зміни щільності.

Сукупний аналіз отриманих результатів свідчить, що ішемія-реперфузія головного мозку має особливості впливу на проліферативні процеси в тимоцитах контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом. Якщо в контрольних щурів дане втручання посилює проліферативні процеси в тимоцитах кіркової, та ще більш суттєво – мозкової зони, то в щурів із діабетом сумарну щільність воно або знижує (кіркова зона), або не впливає на даний показник (мозкова зона). Однак в обох структурно-функціональних відділах залози тварин із поєднаною патологією активність мітотичних процесів у незрілих тимоцитах зростає, а у функціонально активних зрілих – знижується.

Висновки

1. У контрольних щурів ішемія-реперфузія головного мозку збільшує сумарну щільність PCNA⁺ тимоцитів за рахунок середніх у кірковій зоні залози та лімфобластів, великих і середніх тимоцитів – у мозковій.

2. У кірковій зоні тимуса цукровий діабет підвищує сумарну щільність тимоцитів за рахунок малих лімфоцитів на тлі зниження щільності лімфобластів, великих та середніх клітин. У мозковій зоні тимуса має місце зворотна ситуація – сумарна щільність PCNA⁺- тимоцитів знижується за рахунок субпопуляції малих при паралельному зростанні щільності лімфобластів та великих тимоцитів.

3. У щурів із поєднанням цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку зменшується щільність малих PCNA⁺- тимоцитів в обох зонах залози на тлі зростання кількості PCNA⁺ лімфобластів, великих та середніх лімфоцитів. Сумарна щільність PCNA⁺- тимоцитів у тварин даної експериментальної групи знижується в кірковій зоні та не змінюється – у мозковій.

Перспективи подальших досліджень. Планується дослідження експресії ядерного антигена клітинної проліферації в субпопуляціях лімфоцитів кіркової та мозкової зон тимуса за умов поєд-

наної дії цукрового діабету та ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку.

Література

1. Антиоксидантная защита и структурные изменения в головном мозге у крыс при экспериментальном сахарном диабете / С.А.Шестакова, Р.П.Степанов, Г.А.Григоренко [и др.] // Пробл. эндокринологии. – 2006. – №1. – С. 37-44.
2. Иммунологические особенности органоспецифических аутоиммунных эндокринных заболеваний / Е.А.Селиванов, Т.В.Глазанова, Л.Н.Бубнова, В.И.Мазуров // Мед. акад. ж. – 2008. – Т.8, №1. – С. 237-242.
3. 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.
4. Камышный А.М. Влияние экспериментального сахарного диабета на процессы дифференцировки лимфоцитов в тимусе у крыс со спонтанной гипертензией / А.М.Камышный // Вісн. морфол. – 2007. - №13(1). – С.48-52.
5. 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.
6. Cerebral blood flow and cerebral edema in rats with diabetic ketoacidosis / N.Yuen, S.E.Anderson, N.Glasser [et al.] / Diabetes. – 2008. – Vol.57, № 10. – P. 2588-2594.
7. Circulating nucleic acids in type 1 diabetes may modulate the thymocyte turnover rate / G. Kocica, V. Pavlovich, L.J. Saranacc, R. Kocicid [et al.] // Cell. Immunol. 2010.–Vol. 266, Is. 1. – P. 76-82.
8. 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.
9. Kyewski B. Central role for central tolerance / B.Kyewski, L.Klein // Ann. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 24. – P. 571-606.
10. Martin-Gronert M. S. Experimental IUGR and later diabetes / M.S Martin-Gronert, S.E.Ozanne // J. Intern. Med. – 2007. – Vol. 261. – P. 437-452.
11. McMillen I.C. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming / I.C.McMillen, J.S.Robinson // Physiol. Rev. – 2005. – Vol. 85. – P. 571-633.
12. Rowell E. A. The role of cyclin-dependent kinases in T-cell development, proliferation, and function / E.A.Rowell, A.D.Wells // Crit. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 26. – P. 189-212.
13. Taub D.D. Insights into thymic aging and regeneration / D.D.Taub, D.L.Longo // Immunol. Rev. – 2005. – Vol. 205. – P. 72-93.

**СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ PCNA⁺-ЛИМФОЦИТОВ В ТИМУСЕ КРЫС СО
СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ
ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

О.В. Ткачук

Резюме. Ишемия-реперфузия головного мозга у контрольных крыс усиливает пролиферативные процессы в тимоцитах корковой, и, более существенно – мозговой зоны. У крыс с сахарным диабетом ишемия-реперфузия мозга снижает суммарную плотность PCNA⁺- тимоцитов в корковой зоне и не влияет на данный показатель – в мозговой. Вместе с тем, в обоих структурно-функциональных отделах железы животных с сочетанной патологией митотическая активность в незрелых тимоцитах возрастает, а в функционально активных зрелых – снижается.

Ключевые слова: сахарный диабет, ишемия-реперфузия головного мозга, PCNA⁺, тимоциты.

**THE STRUCTURE OF THE POPULATIONS OF PCNA⁺ LYMPHOCYTES IN THE THYMUS
OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES, COMPLICATED WITH
ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF THE BRAIN**

O.V. Tkachuk

Abstract. Ischemia-reperfusion of the brain in control rats enhances the proliferative processes in the thymocytes of the cortical zone and, more significantly – in the medullary one. In rats with diabetes, mellitus cerebral ischemia-reperfusion reduces the total density of PCNA⁺ - thymocytes in the cortical zone or has no effect on this index (the medullary zone). However, in both structural-functionally parts of the glands of animals with combined pathology the mitotic activity in immature thymocytes increases, and in functionally active mature thymocytes it is reduced.

Key words: diabetes mellitus, brain ischemia-reperfusion, PCNA⁺, thymocytes.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. В.Ф.Мислицкий

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 4 (60). – P. 98-101

Надійшла до редакції 29.06.2011 року