УДК 616.831-005.4:616.379-008.64 : 612.438.1-019

© Колектив авторів, 2012.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПРОЦЕСІВ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА АПОПТОЗУ В ТИМУСІ ЩУРІВ ІЗ ПОЄДНАНОЮ ДІЄЮ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ ТА НЕПОВНОЇ ГЛОБАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

О.В. Ткачук, Т.М. Бойчук, С.С. Ткачук, В.Ф. Мислицький, О.М. Лєньков

Буковинський державний медичний університет, кафедра фізіології ім. Я.Д.Кіршенблата (зав. – проф. С.С. Ткачук), м. Чернівці.

CORRELATION BETWEEN PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THYMUS OF RATS WITH COMBINED EFFECT OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS AND INCOMPLETE GLOBAL BRAIN ISHEMIA

O.V. Tkachuk, T.N. Bojchuk, S.S. Tkachuk, V.F. Myslytskyi, O.M. Lenkov

SUMMARY

The effect of bilateral carotid ischemia-reperfusion on the correlation between apoptosis and proliferation of thymocytes in the control rats and rats with experimental diabetes mellitus has been studied. It was ascertained that diabetes modifies the relationship between the processes of apoptosis and proliferation of thymocytes, resulting in ischemia-reperfusion injury of the brain.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В ТИМУСЕ КРЫС С СОЧЕТАННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА И НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.В. Ткачук, Т.Н. Бойчук, С.С. Ткачук, В.Ф. Мыслицкий, А.М. Леньков

РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние двусторонней каротидной ишемии-реперфузии на соотношение процессов апоптоза и пролифераци тимоцитов у контрольных крыс и крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Показано, что сахарный диабет модифицирует характер взаимоотношений между процессами апоптоза и пролиферации тимоцитов, возникающие при ишемии-реперфузии головного мозга.

Ключові слова: цукровий діабет, ішемія-реперфузія головного мозку, тимус, апоптоз, проліферація.

У підтриманні нормального морфофункціонального стану будь-якого органу, в тому числі й тимуса, значна роль належить збалансованим взаємовідносинам процесів загибелі клітин та їх проліферації [8, 9]. Порушення апоптотичної та проліферативної активності клітин лімфоїдної популяції тимуса за умов цукрового діабету (ЦД) підтверджені експериментально [2, 3], однак подібні дослідження при ускладненні ЦД ішемічно-реперфузійним ушкодженням мозку в літературі відсутні. Разом із тим, враховуючи значну роль автоімунних процесів у патогенезі як ЦД, так й ішемічно-реперфузійного ушкодження нервової тканини [1, 4, 6, 7], можна очікувати, що поєднання цих патологічних станів неминуче вплине на процеси загибелі та проліферації тимоцитів.

Тому ми поставили за мету співвіднести активність апоптотичних і проліферативних процесів у тимоцитах кіркової та мозкової зони загруднинної залози за умов неповної глобальної ішемії-реперфузії головного мозку, чотиримісячного ЦД і поєднання цих патологічних станів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведено на шестимісячних білих нелінійних щурах контрольної групи та тваринах того ж віку з чотиримісячним ЦД, який відтворювали однократним внутрішньочеревним уведенням стрептозотоцину (Sigma, США, 60 мг/кг маси) двомісячним щурам [2, 3]. 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 добу після ішемії-реперфузії мозку тварин виводили з експерименту декапітацією 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 тимоцитів проводили імуноцитофлуоресцентне визначення ядерного антигена клітинної проліферації PCNA – кофактора ДНК-полімерази-дельта, необхідного для реплікації ДНК у S-фазі [90], який є одним із показників мітотичної активності клітини [10]. Зрізи тимуса депарафінували в ксилолі, регідрували в нисхідних концентраціях етанолу, тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (pH =7,4), 18 год інкубували з первинними антитілами – мишачими IgG2a до PCNA щура (Sigma Chemical, США) у вологій камері при T=4° C. Надлишок первинних антитіл відмивали в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хв (T=37° C) зі вторинними

антитілами (антитіла кроля до повної молекули IgG миші, кон'юговані з FITC (Sigma Chemical, США) у розведенні 1:64, промивали 0,1 М фосфатним буфером, заключали в суміш гліцерину й фосфатного буфера (9:1) для люмінесцентної мікроскопії.

Білок p53 виявляли методом подвійної імунофлуоресценції, для чого регідровані зрізи тимуса упродовж 18 год інкубували у вологій камері при t=4° С одночасно з первинними кролячими моноклональними антитілами до p53 щура та мишачими моноклональними антитілами до CD4 щура (Beckman Coulter, США), кон'югованими з FITC, промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину та фосфатного буфера (9:1) для наступної люмінесцентної мікроскопії.

$PCNA^+$- та $p53^+$-лімфоцити кіркової і мозкової зон тимуса ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [2, 3].

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження представлено в таблицях 1, 2.

Таблиця 1

Щільність $PCNA^+$- тимоцитів та питомий уміст у них білка PCNA у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)

Група спостереження	Сумарна щільність $PCNA^+$-клітин	$PCNA^+$-лімфобласти	$PCNA^+$-великі лімфоцити	$PCNA^+$ - середні лімфоцити	$PCNA^+$-малі лімфоцити
Кіркова зона					
Контроль	1078±19	9,56±1,56 0,606±0,022	27,30±1,73 0,572±0,008	226,5±9,6 0,566±0,002	812,5±23,5 0,544±0,002
Ішемія-реперфузія	1167±15*	11,1±1,33 0,679±0,012*	32,1±2,05 0,633±0,008*	278±7,50* 0,611±0,003*	842±14,0 0,580±0,002*
Діабет	1150±18*	3,16±0,54* 0,847±0,057*	13,20±1,87* 0,679±0,026*	161,8±6,49* 0,597±0,004*	996,0±20,3* 0,532±0,001*
Діабет та ішемія-реперфузія	1079±13^	12,70±1,73^ 0,652±0,011^	42,48±3,10^ 0,616±0,007^	326,4±8,96^ 0,586±0,002	696,1±12,8^ 0,531±0,001
Медулярна зона					
Контроль	874,4±25,4	4,48±1,61 0,613±0,019	19,93±3,24 0,610±0,011	207,8±10,4 0,575±0,004	637,2±23,4 0,536±0,002
Ішемія-реперфузія	1018±16*	18,90±1,89* 0,690±0,013*	44,76±2,94* 0,679±0,008*	338,9±8,28* 0,652±0,003*	609,6±14,6 0,619±0,002*
Діабет	797,0±22,4*	12,6±2,47* 0,707±0,028*	28,93±3,34* 0,734±0,024*	191,3±9,78 0,651±0,007*	563,3±24,2* 0,570±0,002*
Діабет та ішемія-реперфузія	804,8±22,2	15,36±2,66^ 0,623±0,027^	53,30±3,86 0,646±0,012^	269,4±10,4^ 0,586±0,002^	462,9±18,4^ 0,536±0,003^

Примітки: у чисельнику - щільність $PCNA^+$ клітин на 1 мм^2 загруднинної залози; у знаменнику – питомий уміст білка PCNA (на 1 мм^2); * – вірогідність змін щодо показників у контрольних тварин; ^ – у тварин із цукровим діабетом

У кірковій зоні, судячи зі зростання сумарної щільності розташуваня $PCNA^+$ тимоцитів та концентрації даного білка в усіх досліджених класах $PCNA^+$-тимоцитів, у контрольних щурів ішемія-реперфузія головного мозку посилила мітотичні процеси в клітинах лімфоїдної популяції залози.

У щурів із ЦД виявлено зростання експресії білка PCNA в усіх класах тимоцитів, кіркової зони за винятком малих, найбільш зрілих та функціонально активних, в яких концентрація PCNA знизилася. Сумарна щільність $PCNA^+$ тимоцитів у щурів із ЦД зросла за рахунок малих, щільність інших класів

Таблиця 2

Щільність p53$^+$- тимоцитів та питомий уміст у них білка p53 у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)

Група спостереження	Сумарна щільність p53$^+$-клітин	p53$^+$-лімфобласти	p53$^+$-великі лімфоцити	p53$^+$ -середні лімфоцити	p53$^+$-малі лімфоцити
Кіркова зона					
Контроль	100±5,88	4,37±0,45 0,670±0,013	8,20±0,63 0,713±0,010	35,4±2,50 0,688±0,005	51,3±3,21 0,567±0,003
Ішемія-реперфузія	25±1,80*	1,08±0,16* 0,582±0,021*	2,12±0,26* 0,642±0,013*	5,88±0,53* 0,568±0,007*	16±1,25* 0,472±0,003*
Діабет	80±5,45*	4,35±0,54 0,698±0,012	8,16±0,83 0,698±0,011	17,1±1,41* 0,617±0,006*	50,0±3,81 0,518±0,003*
Діабет та ішемія-реперфузія	34±2,44$^{\#}$	3,16±0,34$^{\#}$ 0,636±0,013$^{\#}$	3,25±0,36^$^{\#}$ 0,634±0,014$^{\#}$	7,81±0,66^$^{\#}$ 0,574±0,006$^{\#}$	19,8±1,42$^{\#}$ 0,479±0,003$^{\#}$
Медулярна зона					
Контроль	35,6±3,50	0,82±0,24 0,667±0,047	3,51±0,62 0,665±0,018	7,92±1,17 0,567±0,012	23±2,19 0,474±0,005
Ішемія-реперфузія	54±3,69*	2,78±0,36* 0,735±0,016	4,13±0,47 0,698±0,013	13±1,09* 0,643±0,007*	34±2,55* 0,518±0,003*
Діабет	11,7±1,14*	0,26±0,11* 0,600±0,084	0,24±0,10* 0,572±0,044	2,67±0,57* 0,564±0,011	8,51±1,66* 0,481±0,006
Діабет та ішемія-реперфузія	23±1,76$^{\#}$	1,37±0,28$^{\#}$ 0,629±0,019	1,89±0,36$^{\#}$ 0,644±0,022	5,31±0,75$^{\#}$ 0,570±0,012	14,4±1,85$^{\#}$ 0,474±0,004

Примітки: у чисельнику – щільність p53$^+$-тимоцитів; у знаменнику – питомий уміст білка p53 (на 1 мм^2); вірогідність змін щодо показників – * – у контрольних тварин; $^{\#}$ – у тварин із цукровим діабетом

PCNA$^+$ тимоцитів достовірно знизилася. Це можна розцінити як пригнічення проліферативних процесів, а зростання сумарної щільності PCNA$^+$-тимоцитів – як компенсаторну реакцію залози на це пригнічення.

При поєднанні ЦД та ішемії-реперфузії головного мозку в лімфобластах, великих і малих тимоцитах знизилася концентрація PCNA, що говорить про суттєве пригнічення проліферативних процесів. Співставлення зазначених даних зі змінами щільності PCNA$^+$-тимоцитів показало, що їх сумарна щільність у тварин даної експериментальної групи знижується, як і щільність малих тимоцитів, однак щільність PCNA$^+$ лімфобластів, великих та середніх тимоцитів достовірно зростає. Схоже, що пригнічення експресії PCNA у всіх класах тимоцитів компенсується зростанням їх кількості, однак на етапі досягнення зрілості кількість проліферуючих малих лімфоцитів різко зменшується.

У мозковій зоні тимуса контрольних тварин після ішемії-реперфузії головного мозку в усіх класах тимоцитів концентрація PCNA зросла, що узгоджується зі зростанням як сумарної щільності PCNA$^+$ тимоцитів, так і всіх класів клітин, за винятком малих, і свідчить про посилення їх проліферативної активності. Схожі зміни вмісту PCNA виявлено в даній зоні щурів із ЦД. Аналіз структури класів тимоцитів у тварин даної групи показав зниження кількості малих PCNA$^+$ тимоцитів при одночасному зростанні числа лімфобластів та великих клітин, яке, однак, не запобігало зниженню сумарної кількості PCNA$^+$ лімфоцитів. Отже, ситуація в цій зоні залози за умов ЦД дещо протилежна тій, яка у тварин даної експериментальної групи мала місце в кірковій зоні – тут зниження загальної кількості проліферуючих тимоцитів до певної міри нівелюється посиленням експресії PCNA в усіх класах клітин.

Поєднання ЦД та ішемії-реперфузії мозку не впливає на сумарну щільність PCNA$^+$ тимоцитів, однак суттєво знижує кількість малих PCNA$^+$ клітин. Хоча при цьому зростає кількість усіх інших PCNA$^+$ класів клітин, проте експресія PCNA, порівняно з показниками за умов ЦД, в усіх класах тимоцитів знижується. Отже, при поєднанні ЦД та ішемії-реперфузії мозку має місце зниження проліферативної активності тимоцитів, особливо зрілих, функціонально активних.

Ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних тварин призвела до зниження в кірковій речовині тимуса сумарної щільності p53-позитивних лімфоцитів за рахунок усіх досліджених класів клітин, та до зниження в них експресії білка p53 (табл. 2), що можна розцінити, як депресію апоптозу. У даній зоні

залози щурів із чотиримісячним ЦД знизилася сумарна щільність p53-лімфоцитів та експресія білка p53 – в середніх і малих. При поєднанні ЦД та ішемії-реперфузії виявлено зниження щільності всіх досліджених класів $p53^+$-лімфоцитів, а відтак – і сумарної, що супроводжувалося зменшенням експресії білка p53 в усіх субпопуляціях тимоцитів.

У мозковій зоні тимуса контрольних тварин у відповідь на ішемію-реперфузію мозку зросла сумарна щільність $p53^+$-позитивних тимоцитів за рахунок збільшення щільності лімфобластів, середніх та малих клітин, однак експресія білка p53 достовірно підвищувалася тільки в середніх і малих, що до деякої міри нівелює наслідки зростання щільності $p53^+$-тимоцитів. У даній зоні залози тварин із ЦД відбулося зниження в 3 рази сумарної щільності $p53^+$-позитивних тимоцитів за рахунок усіх класів клітин без достовірних змін експресії білка p53. У мозковій зоні тимуса щурів, яким на тлі ЦД моделювали ішемію-реперфузію головного мозку, ступінь експресії білка в тимоцитах не змінився, однак щільність усіх класів $p53^+$-тимоцитів зросла порівняно з ЦД.

Проведені дослідження продемонстрували суттєвий вплив ЦД на характер взаємовідносин між процесами апоптозу та проліферації тимоцитів, які виникають за умов ішемії-реперфузії головного мозку, і частково можуть пояснити специфічність імунної дисфункції за зазначених експериментальних умов.

ВИСНОВКИ

1. За сумарними змінами щільності $p53^+$- та $PCNA^+$-тимоцитів і вмісту в них відповідних білків у контрольних тварин ішемія-реперфузія головного мозку призводить до зростання інтенсивності процесів проліферації на тлі пригнічення апоптозу в кірковій зоні залози та до паралельного зростання інтенсивності обох процесів – у мозковій.

2. У кірковій зоні тимуса тварин із цукровим діабетом ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку гальмує апоптотичні процеси в усіх досліджених класах тимоцитів, а проліферативні – в найбільш зрілих малих, у мозковій зоні – стимулює апоптоз на тлі пригнічення експресії білка PCNA в усіх класах лімфоїдних клітин (порівняно з показниками у тварин із діабетом).

ЛІТЕРАТУРА

1. Бояджян А.С., Аракуелова Э.А., Айвазян В.А., Манукян Л.А. Интерлейкины и хемокины при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном диабетом // Цитокины и воспаление. – 2008. –Т. 7, № 1. – С. 40-43.

2. Камишний О.М. Вплив введення блокатора NOS N-нітро-L-аргініну на рівень експресії білка p53 у тимусі щурів з експериментальним цукровим діабетом / О.М. Камишний // Вісник наукових досліджень.- 2008.- №4.-С.72-74.

3. Камышный А.М. Особенности экспрессии белка p53 в тимусе у крыс с экспериментальным сахарным диабетом / А.М. Камышный // Морфологія (online).- 2009.- №1.-С. 38-43.

4. Прогностическое значение маркеров воспаления и аутоантител к нейроспецифическим антигенам у больных с острым ишемическим инсультом / Н.Ю.Рулева, П.Р.Камчатнов, Т.К.Люкова // Нервные клетки и их иммунные функции // Аллергология и иммунология. - 2004. - Т.5, №1. - С.211.

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

6. Importance of a thymus dysfunction in the pathophisiology of type 1 diabetes / V.Geenen, F.Brilot, C.Louis [et al.] // Rev. Med. Liege. – 2005. – Vol. 60, № 5-6. – P. 291-295.

7. 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.

8. Marsden V. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more / V.Marsden, A.Strasser // Annu. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 21. – P. 71-105.

9. Moldovan G.L. PCNA, the maestro of the replication fork / G.L.Moldovan, B.Pfander, S.Jentsch // Cell. – 2007. – Vol.129, № 4. – P. 665-679.

10. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair / J.Essers, A.F.Theil, C.Baldeyron [et al.] // Mol. Cell. Biol.–2005.–Vol.25, № 21.– P. 9350-9359.