

Порівняльна характеристика активності апоптотичних процесів у корі різних часток великих півкуль при експериментальній ішемії-реперфузії на тлі цукрового діабету

Т.М. Бойчук, Т.І. Кметь

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці; e-mail: kmet.taras@bsmu.edu.ua

Досліджено вплив цукрового діабету (ЦД) на динаміку інтенсивності апоптозу нейроцитів і гліоцитів кори лобової, тім'яної та скроневої часток півкуль головного мозку щурів за умов його ішемічно-реперфузійного пошкодження. Встановлено, що після 20-хвилинної каротидної ішемії з одногодинною реперфузією у тварин без ЦД рівень апоптотичних процесів в нейро- та гліоцитах кори лобової частки залишався незмінним; у корі тім'яної частки активувався апоптоз нейроцитів, у корі скроневої частки – нейро- і гліоцитів. ЦД впродовж 3 міс посилював апоптоз нейронів і гліальних клітин кори лобової та скроневої часток, нейронів кори тім'яної частки та знижував – гліоцитів. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із порушенням вуглеводного обміну активність апоптотичних процесів не змінювалася в КЛЧ і КСЧ та знижувалася – в КТЧ за рахунок гліальних клітин. На 12-ту добу у щурів без ЦД спостереження в корі скроневої частки зростала активність апоптотичних процесів у нейроцитах і знижувалася – в гліоцитах, у корі лобової та тім'яної часток зменшувалася в гліоцитах. У нейроцитах низька концентрація білка p53⁺ відмічалася на тлі зростання щільності p53⁺-клітин. У щурів із діабетом у цей час активність апоптотичних процесів у цілому знижувалася як у нейронах, так і в гліальних клітинах усіх часток кори. Отримані результати свідчать про наявність регіонарних відмінностей динаміки реагування досліджених часток кори великих півкуль на ішемічно-реперфузійне пошкодження за інтенсивністю апоптозу нейронів та гліальних клітин, а також про модифікований вплив ЦД на реакцію вивчених показників.

Ключові слова: цукровий діабет; ішемія-реперфузія головного мозку; кора великих півкуль; апоптоз.

ВСТУП

Протягом останніх років цукровий діабет (ЦД) став глобальною медико-соціальною проблемою. У більшості країн світу він посідає третє місце серед причин смерті [1]. Наявність цього захворювання в декілька разів підвищує ймовірність виникнення гострих порушень мозкового кровообігу, зокрема, ішемічного інсульту [2 - 4].

Останніми роками при вивченні молекулярно-генетичних аспектів формування основних чинників ризику виникнення ендокринних та цереброваскулярних захворювань активно досліджуються механізми

клітинної смерті [5, 6]. З'ясування шляхів загибелі нейронів та гліальних клітин (некроз чи апоптоз) є одним із критеріїв індивідуальної чутливості різних часток неокортекса до цереброваскулярних уражень, оскільки відомо, що апоптотичну загибель клітин вважають “меншим злом” для головного мозку, незважаючи на те, що загальна їх кількість зменшується [7]. Беручи до уваги складність методик оцінки та швидко елімінацію апоптотичних клітин, визначення їх сумарної частки в ішемізованій ділянці головного мозку є непростим завданням, тому такі дослідження є актуальними [8].

© Т.М. Бойчук, Т.І. Кметь

Характеристик активності процесів апоптозу в різних структурах мозку при ішемічно-реперфузійних пошкодженнях чи ЦД в літературі достатньо, однак за умов поєднання таких патологічних станів дослідження поодинокі. Зокрема, підтверджені експериментально порушення апоптотичної активності у тварин із ЦД в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді в гіпокампі [9], однак порівняння інтенсивності апоптозу в різних частках кори в динаміці спостереження відсутнє.

Мета нашого дослідження – порівняльний аналіз чутливості нейроцитів та гліоцитів кори лобової, тім'яної та скроневої часток півкуль головного мозку (КЛЧ, КТЧ та КСЧ відповідно) щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом до неповної глобальної ішемії-реперфузії за активністю процесів апоптозу.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 66 нелінійних білих самцях щурів контрольної групи та тваринах з ЦД, який моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням двомісячним тваринам стрептозотину у дозі 60 мг/кг («Sigma», США) [10]. Експериментальну групу склали щури із рівнем глікемії вище ніж 10 ммоль/л. По досягненні 5 міс у частини тварин контрольної групи та тих, що мали ЦД (n=11), моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію, для чого під внутрішньоочеревинним наркозом (каліпсол, 75 мг/кг) переднім середнім шийним доступом виділяли обидві загальні сонні артерії, на які накладали кліпси впродовж 20 хв. Після цього кровотік по судинах відновлювали для досягнення реперфузії [11]. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії частину тварин виводили з експерименту через годину по завершенні реперфузійного періоду, а відстрочених – на 12-ту добу.

Евтаназію здійснювали під каліпсоловим наркозом відповідно до основних положень GLP (1981 р.) Конвенції Ради Європи про охо-

рону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.; Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Мозок виймали на холоді. За координатами стереотаксичного атласу [12] виділяли кору лобової, тім'яної та скроневої часток і поміщали їх у фіксатор Буена на 24 год. Виготовляли серійні зрізи з відповідних відділів кори товщиною 5 мкм, депарафінували їх у ксилолі, здійснювали регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (96, 90, 70, 50 %) і тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Вміст білка р53 визначали методом подвійної імунофлуоресценції, для чого регідровані зрізи мозку впродовж 18 год інкубували у вологій камері при 4°С одночасно з первинними кролячими моноклональними антитілами до р53 щура та мишачими моноклональними антитілами до CD4 щура («Beckman Coulter», США), кон'югованими з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв при 37°С зі вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували козячі антитіла до повної молекули IgG кроля, кон'юговані з Texas Red («Santa Cruz Biotechnology», США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину та фосфатного буфера (9:1) для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

Зрізи вивчали у флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP («Zeiss», Німеччина). Досліджували щільність розташування р53⁺-клітин різних часток кори головного мозку за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Німеччина) та концентрацію у них білка р53⁺ [13].

Статистичну значимість відмінностей оцінювали за критерієм t Стьюдента для незалежних вибірок. Результати подано у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено (таблиця), що каротидна ішемія з одноденною реперфузією вплинула на щільність розташування р53⁺ нервових клітин лише у КСЧ, спричинивши зростання на 34 % щодо контролю. Проте слід зазначити, що в цей період у нейроцитах КТЧ вірогідно (на 19 %) зросла концентрація білка р53⁺, що при незмінній кількості апоптотичних клітин може свідчити про посилення апоптозу. Таким чином, нейроцити КСЧ і КТЧ реагували на ішемію-реперфузію вже в ранньому періоді спостереження, однак за рахунок різних механізмів – у першому випадку – це збільшення числа апоптотично змінених клітин, у другому – поглиблення вже існуючих змін. Незважаючи на те, що вірогідних змін щільності р53⁺-гліальних клітин у тварин в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді не зафіксовано в жодній із досліджуваних часток неокортекса, у гліоцитах КСЧ концентрація білка р53⁺ зросла на 4 % (P<0,001), що говорить про посилення апоптозу. Водночас у КТЧ відбувся перерозподіл відсотка щільності апоптотично змінених нейро- та гліоцитів: частка р53⁺-нейроцитів зросла на 29 % (P<0,01) при одночасному зменшенні на 10 % (P<0,01) частки гліоцитів стосовно відповідних показників у шурів контрольної групи. Отже, можна зазначити, що за всіма дослідженими показниками у тварин без ЦД у ранньому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження найбільшою стійкістю характеризувалася КЛЧ.

За даними літератури [14] експресія білка р53⁺ активується при пошкодженнях генетичного апарату клітин, а також при ішемічних стимулах, особливо в центральній нервовій системі. Функція білка р53 полягає у видаленні з пулу реплікованих клітин, які пошкоджені або є потенційно небезпечними для організму. При відсутності пошкоджень генетичного апарату білок р53 знаходиться в неактивному стані, а при появі – ДНК активується [15]. Тому виявлені коливання його вмісту характеризують ступінь чутливості клітин до ішемії.

У пізньому постішемічному періоді (12-та доба) у КЛЧ й КСЧ півкуль головного мозку спостерігалось вірогідне зростання щільності р53⁺-нейроцитів у 2 та 1,8 раза відповідно стосовно контролю і у 2,4 та 1,4 раза відповідно щодо раннього постішемічного періоду. Однак у КЛЧ цей показник зростав на тлі зниження концентрації в клітинах білка р53⁺ на 11 %, що може свідчити про ініціацію захисних механізмів, здатних протидіяти апоптозу. В КСЧ вірогідних змін концентрації білка р53⁺ не виявлено. Водночас, незважаючи на відсутність змін щільності р53⁺ нейроцитів, у КТЧ концентрація білка р53⁺ в цих клітинах зменшувалася вдвічі (P<0,001). Таким чином, на тлі незмінної кількості апоптотичних клітин, наймовірніше, знижувалася експресія білка р53⁺. Динаміка реагування нейроцитів різних часток неокортекса на ішемічно-реперфузійні пошкодження мала свої особливості, хоча порівняно з раннім терміном спостереження у КЛЧ, КСЧ, КТЧ вміст цього білка вірогідно знизився на 10, 8 % та у 2,4 раза відповідно. Однак у КЛЧ і КСЧ це відбулося на тлі незмінного показника в ранньому терміні спостереження, а в КТЧ – після його попереднього зростання.

На 12-ту добу спостереження щільність р53⁺-гліоцитів стосовно показників контрольної групи не змінилася в КЛЧ і знизилася – в КТЧ і КСЧ в 4,7 раза та на 28 % відповідно. У гліоцитах усіх досліджених часток кори виявлено також вірогідне зниження концентрації білка р53⁺: на 13, 16, 3 % та 12, 18, 7 % у КЛЧ, КТЧ і КСЧ відповідно щодо контрольних значень і таких у ранній термін спостереження, що в сукупності з порівнянням зі змінами щільності клітин характеризувало послаблення процесів апоптозу.

Аналіз відсоткового співвідношення апоптотично змінених нейро- та гліоцитів засвідчив зростання в цей період частки нервових клітин як щодо контролю, так і раннього терміну спостереження (на 64, 228 і 106 % та 111, 154, 64 % для КЛЧ, КТЧ і КСЧ відповідно) й зменшення частки гліальних (в 1,3, 4,1,

Експресія білка p53⁺ нервових та гліальних клітин у корі різних часток великих півкуль щурів зі стрептозоточиніндукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку на 1 мм² (M±m); (n=11)

Схема дослідження	Нервові клітини		Гліальні клітини	
	Щільність p53 ⁺ -нейроцитів (мм ²)	Концентрація білка p53 ⁺	Щільність p53 ⁺ - гліоцитів (мм ²)	Концентрація білка p53 ⁺
Кора лобової частки				
Контроль	21,89±2,13 (25,88±2,51)	0,408±0,006	62,48±5,06 (74,12±2,51)	0,381±0,003
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	17,64±1,87 (20,05±2,03)	0,403±0,006	64,42±5,60 (79,95±2,03)	0,375±0,002
Ішемія-реперфузія (12 діб)	42,11±4,69* [^] (42,45±3,45)* [^]	0,365±0,005* [^]	58,01±5,65 (57,54±3,45)* [^]	0,332±0,003* [^]
Діабет	19,77±2,27 (28,08±3,47)	0,449±0,006*	53,87±5,65 (71,91±3,47)	0,395±0,003*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	19,54±2,09 (28,32±2,95)	0,456±0,005	56,19±6,19 (71,68±2,95)	0,400±0,003
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	21,28±3,37 (63,30±6,43)#&	0,399±0,011#&	56,26±3,71 (36,70±3,43)#&	0,389±0,003&
Кора тім'яної частки				
Контроль	21,00±1,20 (24,88±1,80)	0,452±0,006	78,64±4,92 (75,12±1,81)	0,395±0,003
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	25,69±2,67 (32,16±2,10)*	0,539±0,007*	72,64±7,26 (67,83±2,10)*	0,403±0,003
Ішемія-реперфузія (12 діб)	19,69±1,93 (81,75±3,16)* [^]	0,228±0,014* [^]	16,72±3,16* [^] (18,25±3,16)* [^]	0,332±0,003* [^]
Діабет	45,9±5,38* (39,86±2,20)*	0,464±0,006	72,52±7,42 (60,14±2,20)*	0,383±0,002*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	29,19±1,41# (32,38±2,02)#	0,442±0,006#	82,06±5,86 (67,62±2,02)#	0,359±0,002#
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	17,18±1,13#& (60,23±3,91)#&	0,365±0,006#&	54,01±6,13& (39,76±3,91)#&	0,339±0,002#&
Кора скроневої частки				
Контроль	20,39±3,02 (20,15±2,58)	0,383±0,012	72,23±7,70 (79,85±2,58)	0,342±0,002
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	27,23±1,66* (25,35±1,68)	0,394±0,004	89,90±4,86 (74,65±1,68)	0,356±0,002*
Ішемія-реперфузія (12 діб)	36,73±4,10* [^] (41,51±3,27)* [^]	0,364±0,005 [^]	51,74±4,82* [^] (58,49±3,27)* [^]	0,332±0,003* [^]
Діабет	26,66±1,47 (38,04±2,67)*	0,441±0,009*	66,15±4,86 (61,96±2,67)*	0,355±0,003*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	28,94±1,53 (37,74±2,83)	0,448±0,009	75,29±6,08 (62,25±2,83)	0,354±0,002
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	24,04±1,82& (20,63±1,74)#&	0,371±0,005#&	106,58±5,88#& (79,36±1,74)#&	0,348±0,001#&

Примітка: вірогідність різниці порівняно з: * - контролем; ^ - ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у контрольних тварин; # - діабетом; & – ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у тварин із діабетом; у дужках – відсоткове співвідношення.

1,4 раза і в 1,4, 3,7, 1,3 раза відповідно).

ЦД впродовж 3 міс призвів до зростання щільності p53⁺ нервових клітин лише в КТЧ у 2,2 раза ($P < 0,001$) щодо контролю. Щільність гліальних клітин цього типу вірогідних змін не зазнала в жодній із досліджених часток кори. Однак слід зауважити, що при цьому в КЛЧ і КСЧ вірогідно зросла концентрація білка p53⁺ у нейро- та гліоцитах на 10 і 4 % та 15 і 4 % відповідно, що говорить на користь деякого посилення інтенсивності апоптозу. Крім того, в КТЧ виявлено зниження на 3 % в гліоцитах ($P < 0,01$).

ЦД модифікував ранню реакцію досліджених параметрів на ішемію-реперфузію (див. таблицю). Із всіх вивчених відділів кори у тварин із порушеним вуглеводним обміном на таке втручання відреагувала лише КТЧ. Зокрема, за наявності цієї патології виявлено вірогідне зниження щільності p53⁺-нейроцитів на 36 % відносно досліджуваного параметра в щурів із діабетом, зменшення концентрації білка p53⁺ в нервових і гліальних клітинах відповідно на 5 і 6 %. Практично таким самим, як і в контролі, був перерозподіл різних видів p53⁺-клітин: зниження на 19 % частки нейронів та зростання на 12 % - гліоцитів.

На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в щурів із ЦД також виявлено особливості реагування досліджених показників у всіх вивчених ділянках кори. Так, у КЛЧ не встановлено вірогідних змін щільності p53⁺-нейроцитів і гліоцитів. Однак знижувалася концентрація білка p53⁺ у нервових і гліальних клітинах на 13 ($P < 0,001$) та 3 % ($P < 0,01$) відповідно стосовно значень попередньої групи тварин. Слід відмітити зростання частки нервових клітин щодо значень у разі ЦД, так і раннього терміну спостереження у 2,3 та 2,2 раза відповідно і зменшення частки гліальних клітин у 2 та 1,95 раза відповідно.

У КТЧ півкуль головного мозку щурів із порушенням вуглеводного обміну на 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду встановлені як якісні, так і кількісні особливості

активності апоптотичних процесів порівняно з контрольними тваринами. Зокрема виявлено: зниження щільності p53⁺-нервових клітин на 63 % стосовно показника за ЦД і на 41 % – щодо раннього терміну та зменшення досліджуваного параметру гліальних клітин на 34 % відносно попереднього терміну. Водночас лише кількісно відрізнялися зміни концентрації білка p53⁺ в нейроцитах та гліоцитах: зниження у щурів із порушенням вуглеводного обміну становило 22 і 12 % щодо значень у тварин із ЦД на 18 і 6 % – стосовно попереднього терміну спостереження. Менш суттєвими були також і зміни відсоткового співвідношення різних класів p53⁺-клітин: частка нейроцитів зросла на 51 та 86 %, а гліоцитів зменшилася в 1,5 та 1,8 раза стосовно відповідних показників у щурів із ЦД та раннього терміну спостереження. Модифікований вплив ЦД на перебіг апоптотичних процесів ішемічно-реперфузійного пошкодження констатовано і в КСЧ. На відміну від зростання у цей період щільності і частки p53⁺-нейроцитів у тварин без ЦД, за наявності порушення вуглеводного обміну щільність таких клітин не змінилася, а частка – знизилася вдвічі стосовно показників за ЦД і на 44 % – щодо раннього періоду спостереження. Протилежно спрямованими виявилися і зміни щільності та частки p53⁺-гліоцитів у щурів без ЦД за рахунок їх зростання на 61 і 28 % стосовно відповідних показників за ЦД і на 42 та 27 % – щодо попереднього терміну. Незважаючи на відсутність на 12-ту добу змін концентрації білка p53⁺ в нейроцитах тварин контрольної групи за умов ЦД у цей період вона зменшувалася на 16 %, і лише її зміни в гліоцитах нагадували такі у щурів без ЦД.

Результати проведеного дослідження свідчать про модифікацію ЦД регіонарної чутливості відділів неокортекса до ішемічно-реперфузійного пошкодження (за показниками вираженості апоптозу нервових та гліальних клітин), що може бути наслідком формування діабетичної енцефалопатії.

ВИСНОВКИ

1. Після 20-хвилинної каротидної ішемії з односторонньою реперфузією за дослідженими показниками у тварин без ЦД рівень апоптотичних процесів в нейро- та гліоцитах КЛЧ залишався незмінним; у КТЧ активувався апоптоз нейронів, у КСЧ – нейро- і гліоцитів. На 12-ту добу спостереження в КСЧ вона зростала у нейронах і знижувалася – в гліоцитах, у КЛЧ і КТЧ зменшувалася в гліоцитах, а в нейронах зниження концентрації білка p53⁺ відбувалося на тлі зростання щільності p53⁺-клітин.

2. ЦД посилював апоптоз нейронів і гліальних клітин КЛЧ та КСЧ, нейронів КТЧ та знижував - гліоцитів останньої.

3. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із порушенням вуглеводного обміну активність апоптотичних процесів не змінювалася в КЛЧ і КСЧ та знижувалася – в КТЧ за рахунок гліальних клітин. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в щурів із ЦД вона у цілому знижувалася як у нейронах, так і в гліальних клітинах усіх часток кори.

4. Динаміка реагування досліджених часток кори великих півкуль на ішемічно-реперфузійне пошкодження за інтенсивністю апоптозу нейронів та гліальних клітин характеризувалася регіонарними особливостями як у щурів без ЦД, так і з його наявністю, однак останній суттєво модифікував реакцію вивчених відділів кори на ішемію-реперфузію.

Т.Н. Бойчук, Т.І. Кметь

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА И НЕПОЛНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МОЗГА НА АПОПТОЗ РАЗНЫХ ДОЛЕЙ НОВОЙ КОРЫ КРЫС

Исследовали влияние сахарного диабета на динамику интенсивности апоптоза нейронов и глиоцитов коры лобной, теменной и височной долей полушарий головного мозга крыс в условиях его ишемически-реперфузионного повреждения. Установлено, что 20-минутная каротидная ишемия с односторонней реперфузией у животных без сахарного

диабета не вызывала апоптотических процессов в нейро- и глиоцитах коры лобной доли; в коре теменной доли активировался апоптоз нейронов, а в коре височной доли – нейро- и глиоцитов. Сахарный диабет на протяжении 3 мес усиливал апоптоз нейронов и глиальных клеток коры лобной и височной долей, нейронов коры теменной доли и снижал - глиоцитов. В раннем ишемически-реперфузионном периоде у животных с сахарным диабетом активность апоптотических процессов не изменялась в коре лобной и височной долей и снижалась в коре теменной доли за счет глиальных клеток. На 12-е сутки у крыс без сахарного диабета в коре височной доли возрастала активность апоптотических процессов в нейронах и снижалась – в глиоцитах, в коре лобной и теменной долей уменьшалась в глиоцитах. У нейронах снижение концентрации белка p53⁺ происходило на фоне роста плотности p53⁺ клеток. У крыс с диабетом активность апоптотических процессов в целом снижалась как в нейронах, так и в глиальных клетках всех долей коры. Полученные результаты свидетельствуют о наличии регионарных различий динамики реагирования исследованных долей коры больших полушарий на ишемически-реперфузионные повреждения по интенсивности апоптоза нейронов и глиальных клеток, а также о модифицирующем влиянии сахарного диабета на реакцию исследованных показателей.

Ключевые слова: сахарный диабет; ишемия-реперфузия головного мозга; кора больших полушарий; апоптоз.

Т.М. Boychuk, T.I. Kmet

PECULIARITIES OF THE INFLUENCE OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIS AND INCOMPLETE ISCHEMIA-REPERFUSION OF THE BRAIN DURING APOPTOSIS OF VARIOUS NEOCORTICAL LOBES OF RATS

The effect of diabetes mellitus on the dynamics of neurocyte and gliocyte apoptosis intensity in the cortex of the frontal, parietal and temporal lobes of the cerebral hemispheres under conditions of ischemic-reperfusion lesion has been studied in experiments on rats. The level of apoptotic processes in the neuro- and gliocytes of the frontal cortex has been found to be unchanged after 20 minutes of carotid ischemia followed by one hour reperfusion according to the indices examined in animals with out diabetes mellitus. Apoptosis of neurocytes is activated in the cortex of the parietal lobe, and that of the neuro- and gliocytes – in the cortex of the temporal lobe. Three-month diabetes mellitus intensifies apoptosis of neurons and glial cells in the cortex of the frontal and temporal lobes, neurons in the cortex of the parietal lobe and decreases apoptosis of gliocytes in it. In early ischemic-reperfusion period the activity of apoptotic processes in the cortex of the frontal and temporal lobes does not change in animals with diabetes mellitus, but it decreases in the cortex of the parietal lobe at the expense of glial cells. On the 12th day of observation the

activity of apoptotic processes in neurocytes of the cortex of the temporal lobe increases in rats without diabetes mellitus, and it decreases in the glial cells. We detected a reduced content of the protein p53 in neurons and increased density of p53⁺-cells. In this period of observation in rats with diabetes mellitus the activity of apoptotic processes decreases in general both in neurons and glial cells of all the lobes. The results obtained point for the availability of regional differences in the dynamics of reaction of the cerebral hemisphere lobes in response to ischemic-reperfusion injury characterized by the intensity of apoptosis of neurons and glial cells. The results also point for modifying effect of diabetes mellitus on the indices studied. Key words: diabetes mellitus; ischemia-reperfusion of the brain; cerebral cortex; apoptosis.

Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi

REFERENCES

1. Ryden L, Grant P, Anker D, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 2013;34:3035-87.
2. Toshio Hayashi, Seinosuke Kawashima, Hideki Nomura, Hideki Itoh, Hiroshi Watanabe, Takashi Ohru, et al. Age, gender, insulin and blood glucose control status alter the risk of ischemic heart disease and stroke among elderly diabetic patients. *Cardiovasc Diab.* 2011;10(1):86-9.
3. Sui X, Lavie CJ, Hooker SP, Lee DC, Colabianchi N, Lee CD, Blair S.N. A prospective study of fasting plasma glucose and risk of stroke in asymptomatic men. *Mayo Clin Proc.* 2011 November;86(11):1042-9.
4. Arboix A, Rivas A, Garcia-Eroles L, de Marcos L, Massons J, Oliveres M. Cerebral infarction in diabetes: Clinical pattern, stroke subtypes, and predictors of in-hospital mortality. *BMC Neurol.* 2005;5(1):5-9.
5. Liu HM, Li JX, Chen LB. Ischemic preconditioning relieves ischemia/reperfusion injury of hippocampus neurons in rat by inhibiting p53 and bax expressions. *Chin Med Sci J.* 2007 Jun;22(2):123-7.
6. Jazayeri L, Callaghan MJ, Grogan RH, Hamou CD, Thanik V, Ingraham CR, et al. Diabetes increases p53-mediated apoptosis following ischemia. *Plast Reconstr Surg.* 2008 Apr;121(4):1135-43.
7. Waring P, Kos F, Mullbacher A. Apoptosis or programmed cell death. *Med Res Rev* 2008;11:219-36.
8. Manskikh V. Morphological methods of verification and quantification of apoptosis. *Bull of Siber Med.* 2004;1:63-70.
9. Tkachuk SS, Lenkov AM. Expression of Hif-1 α , p53 and Bcl-2 proteins in the brain under the conditions of bilateral carotid ischemia-reperfusion in experimental diabetes mellitus in male rats. *Clin and Exp Pathol.* 2010;2(32):111-13. [Ukrainian].
10. Bassirat M, Khalil Z. Short- and long-term modulation of microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats by glycosylated products. *J Diab Compl.* 2008;22(6):371-6.
11. Skibo GG. The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions. *Patologija.* 2004;1(1):22-30. [Russian].
12. Konig JF, Klippel PA. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1963;162 p.
13. Kolesnik YM, Abramov AV. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement. *Microscopy and Analysis.* 2002;5:12-16.
14. Hammond EM, Giaccia AJ. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:718-25.
15. Zhao Jiang, Chun-Hua Chen, Ying-Yu Chen, Jing-Yan Han, John Riley, Chang-Man Zhou. Autophagic effect of programmed cell death 5 (PDCD5) after focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Neurosci Lett.* 2014 Apr 12;566:298-303.

Матеріал надійшов до редакції 09.11.2015