

# Співвідношення p53-про- та Bcl-2-антиапоптотичної активності в гіпокампі щурів з ішемією-реперфузією головного мозку та експериментальним діабетом

Т.М. Бойчук, О.М. Ніка, С.С. Ткачук

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці; e-mail: ajnora14@rambler.ru

*Досліджено динаміку балансу показників p53-про- та Bcl-2-антиапоптотичних процесів у гіпокампі щурів з експериментальним цукровим діабетом (ЦД), ускладненим неповною глобальною ішемією-реперфузією головного мозку. Показано, що у тварин без ЦД після 20-хвилинної ішемії/одногодинної реперфузії в усіх полях гіпокампа активуються p53-проапоптотичні процеси на тлі посилення Bcl-2-антиапоптотичних у полях CA1, CA2, CA4 та їх депресії – у полі CA3. У ранньому постішемічному періоді в щурів із ЦД активність p53-проапоптотичних процесів у полях CA1, CA3, CA4 достовірно перевищує таку в щурів без діабету (площа p53-ІРМ на 110, 60, та 27 %), а в полі CA2 є суттєво нижчою. На 12-ту добу постішемічного періоду активація апоптозу в полі CA1 відбувається на тлі інертних антиапоптотичних процесів як у тварин без ЦД, так і з його наявністю, однак показники активності апоптозу в щурів із ЦД вищі (питомий вміст білка p53 та площа p53-ІРМ на 38 і 43 %). У цей період у полі CA2 тварин без ЦД виявлено деяку депресію антиапоптотичних процесів із незначним переважанням проапоптотичних, а на тлі ЦД – депресію обох механізмів, більше – антиапоптотичного; у полі CA3 щурів без ЦД – збереження активності проапоптотичних процесів та поглиблення в динаміці депресії антиапоптотичних, а за умов ЦД – пригнічення обох механізмів при суттєвішій депресії антиапоптотичного. На 12-ту добу експерименту в полі CA4 спостерігалися найзбалансованіші взаємовідносини вивчених процесів за рахунок їх паралельних та односпрямованих змін як у щурів без ЦД, так і з його наявністю. Результати свідчать про модифікуючий вплив ЦД на чутливість полів гіпокампа до ішемічно-реперфузійних пошкоджень.*

*Ключові слова: гіпокамп; цукровий діабет; ішемія-реперфузія головного мозку; апоптоз.*

## ВСТУП

Наслідки активації глутамат-кальцієвого каскаду упродовж перших годин ішемічно-реперфузійного ушкодження головного мозку зберігають свою значущість і в більш пізні терміни [1-4]. Вони індукують і підтримують віддалені наслідки ішемії, і в першу чергу – реакцію геному на гостру церебральну ішемію з включенням молекулярних програм [5-7]. Відомо, що разом з іншими відстроченими наслідками ішемії, активну участь у «доформуванні» вогнища інфаркту бере апоптоз, додатково пошкоджуючи зону пенумбри [8, 9]. Стійкість нейронів до ішемічних впливів значною мірою визначається співвідношенням їх про- та антиапоптотичного

© Т.М. Бойчук, О.М. Ніка, С.С. Ткачук

потенціалу, яке суттєво залежить від балансу продуктів активації проапоптотичного гена p53 та антиапоптотичного – Bcl-2 [9, 10].

Важлива роль процесам апоптозу належить також у формуванні діабетичної енцефалопатії [11-13]. Взаємозв'язок цукрового діабету (ЦД) і зростання частоти та тяжкості перебігу інсультів доведений [14, 15], однак його механізми залишаються дослідженими недостатньо. У зв'язку з цим ми поставили за мету проаналізувати динаміку співвідношення p53-про- та Bcl-2-антиапоптотичної активності в полях гіпокампа щурів із ЦД, ускладненим неповною глобальною ішемією-реперфузією головного мозку.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на самцях білих нелінійних щурів, яких поділили на 6 груп. До I групи увійшли контрольні тварини, до II – щури, яким моделювали двобічну 20-хвилинну каротидну ішемію з одногодинною реперфузією, до III – щури, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії, до IV – тварини з експериментальним ЦД, до V – щури з ЦД, яким моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію з одногодинною реперфузією, до VI – щури з ЦД, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії.

ЦД відтворювали внутрішньоочеревинним уведенням стрептозоточину («Sigma», США, 60 мг / кг) двомісячним щурам [16]. Через 4 міс у частини щурів із ЦД та в групі щурів аналогічного віку без діабету кліпсуванням обох загальних сонних артерій протягом 20 хв моделювали неповну глобальну ішемію мозку [17]. Ранні наслідки ішемічно-реперфузійного пошкодження гіпокампа вивчали через 1 год від початку реперфузії, а відстрочені – на 12-ту добу після моделювання ішемії. Наявність ЦД верифікували визначенням вмісту глюкози в крові (глюкозооксидазним методом) та вивченням морфологічного стану підшлункової залози; експериментальні групи формували з щурів, в яких рівень глікемії дорівнював або перевищував 10 ммоль/л.

Оперативні втручання та евтаназію тварин здійснювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг внутрішньоочеревинно). Головний мозок якомога швидше вилучали в умовах низької температури, згідно з координатами стереотаксичного атласу [18] виділяли ділянки, що містять поля гіпокампа CA1, CA2, CA3 та CA4 і поміщали їх для 24-годинної фіксації в 10 %-й розчин Буена. Після відповідної гістологічної проводки здійснювали заливку препаратів у парафінові блоки.

Білки Vcl-2 та p53 виявляли методом імунофлуоресценції у серійних зрізах полів гіпокампа товщиною 5 мкм. Зрізи депарафінували в ксилолі, регідрували в нисхідних концентраціях етанолу, тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,4). Для визначення вмісту білка Vcl-2 зрізи протягом 18 год інкубували у вологій камері при 4° 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 зрізи інкубували 60 хв (37° C) зі вторинними антитілами (козячі антитіла до повної молекули IgG миші, кон'юговані з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC, «Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64.

Для визначення вмісту білка p53 регідровані зрізи гіпокампа упродовж 18 год інкубували у вологій камері при 4° C 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.

Vcl-2<sup>+</sup>- та p53<sup>+</sup>-клітини гіпокампа ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Німеччина) [19].

Дослідження здійснювали з дотриманням основних положень GLP (1981 р.) Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.; Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Статистичну значимість відмінностей оцінювали за критерієм t Стьюдента для незалежних виборок. Результати представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У полі гіпокампа СА1 шурів без ЦД після 20-хвилинної ішемії з одногодинною реперфузією у 2,1 рази зросла площа р53-імунореактивного матеріалу та питомий вміст білка р53, а також площа Bcl-2-ІРМ (в 1,4 рази) та питомий вміст білка Bcl-2 (в 1,2 рази) на тлі зниження на 33 % концентрації білка Bcl-2 (табл. 1, 2). Таким чином, у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді тут суттєво переважала активація проапоптотичних механізмів. У полі СА2 в цей час також виявлено активацію обох механізмів, що проявилось зростанням концентрації, питомого вмісту білка р53 та площі р53-ІРМ (у 2,9, 4,3 і 1,3 рази відповідно) на тлі збільшення питомого вмісту білка Bcl-2, площі Bcl-2-ІРМ (в 1,3 рази та на 63 %) і зниження концентрації цього білка (на 25 %). Отже, як і в полі СА1, активація проапоптотичних механізмів переважала над такою антиапоптотичних. У полі СА3 активація апоптозу (зростання питомого вмісту білка р53 та площі р53-ІРМ) відбувалася на тлі депресії антиапоптотичних процесів (зниження питомого вмісту білка Bcl-2 та площі Bcl-2-ІРМ), а в полі СА4 активація обох процесів була більш збалансованою, хоча активність апоптозу дещо переважала.

На 12-ту добу спостереження в полі гіпокампа СА1 шурів без фонового ЦД активність р53-залежних апоптотичних процесів залишалася приблизно на тому ж рівні, що й у ранньому терміні, а показники Bcl-2-залежних антиапоптотичних механізмів повернулися до рівня контрольних шурів. Отже, активація апоптозу в пізньому постішемічному періоді в полі СА1 відбувалася на тлі інертних антиапоптотичних процесів. У полі СА2 в цей час активність р53-проапоптотичних процесів дещо зменшувалася порівняно з раннім постішемічним терміном: повернулися до значень показників у тварин контрольної групи концентрація білка р53 та площі р53-ІРМ, а також знизився стосовно попереднього терміну спостереження питомий вміст білка р53.

Динаміка Bcl-2-антиапоптотичних процесів полягала в поверненні до рівня контролю площі Bcl-2-ІРМ та зниженні питомого вмісту білка Bcl-2. Оскільки концентрація білка Bcl-2 залишалася зниженою стосовно контролю, тому можна говорити про деяку депресію в цьому полі гіпокампа антиапоптотичних процесів та не дуже суттєве переважання проапоптотичних. У полі СА3 стосовно контролю знижувалася концентрація білка р53, залишалися підвищеними його питомий вміст та площа р53-ІРМ, зросла концентрація білка Bcl-2, однак зниження його питомого вмісту та площі Bcl-2-ІРМ стало суттєвим, ніж у ранньому терміні. Отже, в цьому полі в пізньому постішемічному періоді зберігався дисбаланс між про- та антиапоптотичними процесами, хоча й на іншому кількісному рівні.

Найбільш збалансовані взаємовідносини вивчених процесів на 12-ту добу постішемічного періоду в групі тварин без ЦД спостерігалися в полі СА4, в якому в цей період поверталися до значень у контрольних шурів питомий вміст білків р53 та Bcl-2 і площа матеріалу, імунореактивного за р53 та Bcl-2.

ЦД спричинив неоднозначні зміни досліджуваних показників у різних полях гіпокампа: у полі СА1, стосовно показників у шурів без такого захворювання, достовірно зросла площа р53-ІРМ, знизилася концентрація та питомий вміст білка Bcl-2, що можна оцінити як зниження антиапоптотичного захисту на тлі деякого посилення апоптозу; у полі СА2 не виявлено змін активності р53-позитивних клітин, але при цьому знизилася концентрація білка Bcl-2, зросли його питомий вміст та площа Bcl-2-ІРМ. Зміни двох останніх показників свідчать про підвищення як кількості Bcl-2-позитивних клітин, так й експресії ними білка Bcl-2. У полі СА3 шурів із ЦД виявлено зниження в 1,4 рази концентрації білка р53, зростання в 1,5 рази його питомого вмісту та у 2 рази – площі р53-ІРМ при одночасному зростанні питомого вмісту білка Bcl-2 (на 61 %) та площі Bcl-2-ІРМ

**Таблиця 1. Вплив ішемії-реперфузії на реакцію p53<sup>+</sup>-клітин полів гіпокампа контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом (M ± m)**

Група спостереження	Концентрація білка p53 (E <sub>100</sub> )	Площа p53-імунореактивного матеріалу на 10 000 мкм <sup>2</sup>	Питомий вміст білка p53 (E <sub>100</sub> )
Поле CA1			
Контроль	0,0041±0,0004	220,023±26,032	0,890±0,195
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0044±0,0003	435,478±44,637*	1,851±0,178*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0049±0,0005	441,657±45,205*	2,120±0,208*
Діабет	0,0037±0,0003	398,466±34,397*	1,286±0,126
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0040±0,0004	916,525±62,99***	3,521±0,368***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0048±0,0004	632,022±59,983***,****	2,928±0,227***
Поле CA2			
Контроль	0,0036±0,0002	625,076±57,356	1,951±0,241
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0104±0,0009*	800,043±69,727*	8,464±3,985*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0042±0,0004**	643,521±64,603	2,647±0,229***
Діабет	0,0040±0,0003	699,684±61,109	2,283±0,200
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0047±0,0005	732,827±73,878	3,321±0,361***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0044±0,0004	563,737±55,519****	2,064±0,311****
Поле CA3			
Контроль	0,0042±0,0002	336,359±32,509	1,307±0,130
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0041±0,0001	586,773±54,216*	2,270±0,242*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0037±0,0001***	461,571±44,328*	1,674±0,139***
Діабет	0,0031±0,0001*	663,05±67,461*	1,981±0,195*
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0033±0,0002	955,43±97,43***	2,468±0,207
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0038±0,0003***	581,898±58,612****,****	1,976±0,143****
Поле CA4			
Контроль	0,0041±0,0002	363,499±43,946	1,369±0,131
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0044±0,0002	701,116±73,506*	2,864±0,243*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0037±0,0001	424,165±49,632**	1,497±0,273**
Діабет	0,0037±0,0007	510,595±52,065*	1,484±0,223
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0029±0,0001	892,845±87,274***	2,386±0,208***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0033±0,0001****	373,018±39,544****,****	1,185±0,246****

**Примітка:** тут та в табл. 2 – 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

(на 60 %). Таким чином, у цьому полі зміни вивчених про- та антиапоптотичних механізмів узгоджені і в кількісному відношенні відрізняються несуттєво. У полі СА4 вияв-

**Таблиця 2. Вплив ішемії-реперфузії на реакцію Vcl-2<sup>+</sup> клітин полів гіпокампа контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом (M ± m)**

Група спостереження	Концентрація білка Vcl-2 (E <sub>1Ф</sub> )	Площа Vcl-2-імунореактивного матеріалу на 10 000 мкм <sup>2</sup>	Питомий вміст білка Vcl-2 (E <sub>1Ф</sub> )
Поле СА1			
Контроль	0,0066±0,0006	286,843±27,545	1,590±0,131
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0052±0,0002*	402,018±41,185*	1,972±0,143*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0063±0,0005**	305,301±32,087**	1,605±0,197
Діабет	0,0047±0,0003*	278,209±30,339	1,198±0,146*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0047±0,0003	567,324±53,737***	2,333±0,234***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0051±0,0004	255,733±60,714****	1,154±0,255****
Поле СА2			
Контроль	0,0060±0,0003	433,303±43,088	2,217±0,232
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0045±0,0003*	707,067±52,372*	2,930±0,192*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0046±0,0002*	379,618±43,872**	1,617±0,202**
Діабет	0,00488±0,000009*	735,929±14,771*	3,446±0,059*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,00397±0,0001***	761,191±60,847	2,821±0,209***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0043±0,0002****	378,549±37,637*****	1,516±0,26*****
Поле СА3			
Контроль	0,0049±0,0002	466,054±45,285	2,122±0,241
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0052±0,0003	337,932±33,238*	1,606±0,141*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0064±0,0005**	226,167±38,269***	1,234±0,147**
Діабет	0,00492±0,00016	746,198±24,45*	3,421±0,064*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0046±0,0002	507,706±58,156***	2,189±0,238***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0054±0,0003****	322,265±43,649*****	1,60±0,107*****
Поле СА4			
Контроль	0,0060±0,0006	392,921±47,829	1,885±0,242
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0051±0,0002	643,459±42,154*	3,003±0,170*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0052±0,0004	315,669±42,550**	1,468±0,230**
Діабет	0,0057±0,0005	383,333±33,860	1,889±0,142
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0041±0,0002***	645,847±62,663***	2,498±0,228***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0049±0,0003****	278,721±29,850*****	1,27±0,263*****

лено зростання площі p53-ІРМ при інших незмінних параметрах активності цього гена; вірогідних змін Bcl-2-залежних процесів не виявлено.

У щурів із ЦД після 20-хвилинної ішемії та одноденної реперфузії в полі СА1 зросли питомий вміст білка p53 та площа p53-ІРМ у 2,7 і 2,3 рази відповідно й питомий вміст білка Bcl-2 і площа Bcl-2-ІРМ в 1,95 рази та 2 рази стосовно показників у щурів із ЦД, неускладненим порушенням церебрального кровообігу. Порівняння абсолютних значень показників активності p53- та Bcl-2 залежних процесів свідчать, що в щурів із діабетом, на відміну від тварин контрольної групи, процеси апоптозу були інтенсивнішими, а напруженість антиапоптотичних процесів значно слабша, ніж проапоптотичних. У полі СА2 щурів із ЦД у ранньому постішемичному періоді реакція p53-позитивних клітин, на відміну від тварин із діабетом без ішемічного втручання, обмежилася зростанням питомого вмісту білка p53 в 1,45 рази. Принципово відмінною в цій групі була також реакція продуктів гена Bcl-2, яка полягала в зниженні питомого вмісту білка Bcl-2 на 18 % (у тварин без діабету він зріс на 32 %). Крім того, в щурів із ЦД була відсутня реакція площі Bcl-2-ІРМ. У сукупності ці факти свідчать про помірну активацію в полі СА2 щурів зазначеної експериментальної групи апоптотичних процесів на тлі депресії антиапоптотичних. У щурів із ЦД в полі СА3 зріс питомий вміст білка p53 та площа p53-ІРМ в 1,25 та 1,44 рази, тобто спрямування реакції було таким, як у тварин без діабету. Однак абсолютні значення цих показників перевищували такі за аналогічного втручання в щурів без діабету на 8 та 60 % відповідно. Отже, у тварин без ЦД постішемичне посилення проапоптотичних впливів відбувалося рівномірно за рахунок зростання числа p53-позитивних клітин та експресії ними білка p53, а у тварин із його наявністю – переважно за рахунок першого механізму. Крім того, у вказаному полі тварин із ЦД знизився питомий вміст білка Bcl-2 (в 1,6

рази) та площа Bcl-2-ІРМ (в 1,5 рази), однак значення цих показників перевищували такі у тварин без діабету в 1,4 та 1,5 рази. У полі СА4 щурів із ЦД після 20-хвилинної ішемії з одноденною реперфузією зросли питомий вміст білка p53 на 74 % та площа p53-ІРМ – на 40 %, а отже, кратність підвищення цих показників була меншою, ніж у тварин без діабету за такого ж втручання. Збільшилися також на 30 % питомий вміст білка Bcl-2 та на 68 % – площа Bcl-2-ІРМ. Слід відмітити таку особливість – у даному полі абсолютні постішемичні значення змінених показників у тварин контрольної групи та щурів із діабетом, на відміну від інших полів, відрізняються мало. Це цілком закономірно, адже ЦД у цій зоні гіпокампа спричинив найменш суттєві зміни p53-залежних проапоптотичних механізмів та не призвів до достовірних порушень Bcl-2-процесів, і навіть додаткове навантаження на досліджувані механізми у вигляді ішемії-реперфузії не спровокувало видимих змін.

На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в полі СА1 тварин із ЦД залишалися підвищеними стосовно відповідних параметрів у тварин із діабетом без порушень мозкового кровообігу питомий вміст білка p53 та площа p53-ІРМ (у 2,3 та 1,6 рази), а отже, процеси апоптозу залишалися посиленними. Водночас, активність Bcl-2-залежних антиапоптотичних процесів поверталася до рівня, притаманного тваринам із ЦД. Таким чином, посилення апоптозу у відстроченому періоді в цьому полі гіпокампа відбувається на тлі відсутності протидії антиапоптотичних процесів. У полі СА2 тварин із ЦД питомий вміст білка p53 повернувся до рівня у тварин із діабетом без ішемічно-реперфузійних ускладнень та достовірно знизилася концентрація білка Bcl-2, його питомий вміст і площа Bcl-2-ІРМ. Останні два показники суттєво знизилися також і стосовно попереднього терміну спостереження, що свідчить про наростання з часом депресії антиапоптотичного потенціалу, яка перева-

жала над пригніченням антиапоптотичного. Динаміка постішемічних змін вивчених показників у полі СА3 щурів із ЦД полягала в достовірному зростанні стосовно параметрів за діабету без порушення церебрального кровообігу концентрації білка р53 (на 22 %) при одночасному зниженні площі р53-ІРМ (на 12 %). Питомий вміст білка р53 повернувся до передішемічного рівня у тварин із діабетом. Зазначені зміни відбувалися на тлі зниження стосовно показників у разі діабету без ішемії мозку площі Vcl-2-ІРМ (у 2,3 раза) та питомого вмісту білка Vcl-2 (у 2,1 раза). Знизилися ці показники і стосовно таких у ранньому постішемічному періоді, що говорить про пролонгацію депресії антиапоптотичної активності, яка переважала над пригніченням р53-проапоптотичної активності. У полі СА4 щурів із ЦД на 12-ту добу постішемічного періоду стосовно показника у тварин з даною патологією без ішемії-реперфузії мозку в 1,4 раза знижувалася площа р53-ІРМ, а питомий вміст білка р53 повертався до рівня у тварин із діабетом. Отже, активація апоптозу в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді на 12-ту добу змінювалася його пригніченням. Така ж закономірність спостерігалася щодо змін Vcl-2-залежних процесів: на 12-ту добу постішемічного періоду порівняно з показниками в щурів із діабетом в 1,5 раза знижувався питомий вміст білка Vcl-2 і в 1,4 раза – площа Vcl-2-ІРМ. Крім того, слід зазначити зниження даних показників стосовно раннього ішемічно-реперфузійного періоду. Таким чином, у цьому полі паралельна активація про- та антиапоптотичних механізмів у ранньому терміні змінювалася більш-менш рівномірним пригніченням обох процесів у пізньому, що свідчить про їх збалансовані зміни упродовж всього періоду спостереження.

## ВИСНОВКИ

1. У тварин без ЦД після 20-хвилинної ішемії з одногороднню реперфузією у всіх полях гіпокампа спостерігається активація

р53-залежних проапоптотичних процесів, кількісно найсуттєвіша в полях СА1 та СА4, на тлі посилення Vcl-2-залежних антиапоптотичних механізмів у полях СА1, СА2, СА4 та зниження активності останніх – у полі СА3.

2. На 12-ту добу постішемічного періоду проапоптотична активність стосовно контролю в полях СА1, СА2, СА3 залишається підвищеною, а в полі СА4 – повертається до рівня у тварин контрольної групи, як і антиапоптотична в полях СА1 та СА4. У полі СА2 остання стосовно контролю знижується, а в полі СА3 її депресія наростає.

3. ЦД активує р53-залежні проапоптотичні механізми у полях СА1, СА3, СА4 та антиапоптотичні Vcl-2-залежні – в полях СА2 і СА3; пригнічує останні в полі СА1 і не впливає на них – у полі СА4.

4. У щурів із ЦД у ранньому постішемічному періоді активність р53-залежних проапоптотичних процесів у полях СА1, СА3, СА4 достовірно перевищує таку в щурів з аналогічним втручанням без діабету, а в полі СА2 – є суттєво нижчою.

5. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в щурів із діабетом активність р53-проапоптотичних процесів стосовно показників за наявності діабету без порушення церебрального кровообігу в полі СА1 залишається підвищеною, в полі СА2 повертається до рівня в щурів із діабетом, а в полях СА3 та СА4 – знижується; Vcl-2-залежна антиапоптотична активність повертається до рівня в щурів із діабетом у полі СА1, знижується – в полі СА4, та зазнає ще більшої, ніж у ранньому періоді, депресії в полях СА2 та СА3.

Т.Н. Бойчук, О.М. Ніка, С.С. Ткачук

## СООТНОШЕНИЕ Р53-ПРО- И VCL-2-АНТИАПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС С ИШЕМИЕЙ-РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ

Исследована динамика баланса показателей р53-про- и Vcl-2-антиапоптотического процессов в гиппокампе крыс с экспериментальным сахарным диабетом (СД), ослож-

ненным неполной глобальной ишемией-реперфузией головного мозга. Показано, что у животных без СД после 20-минутной ишемии/одноразовой реперфузии во всех полях гиппокампа активируются p53-проапоптотические процессы на фоне усиления Bcl-2-антиапоптотических в полях CA1, CA2, CA4 и их депрессии – в поле CA3. В раннем постischemическом периоде у крыс с СД активность p53-проапоптотических процессов в полях CA1, CA3, CA4 достоверно превышает таковую у крыс без диабета (по площади p53-ИРМ на 110, 60 и 27 %), а в поле CA2 является более низкой. На 12-е сутки постischemического периода активация апоптоза в поле CA1 происходит на фоне инертных антиапоптотических процессов как у животных без СД, так и с его наличием, однако показатели, характеризующие активность апоптоза, у крыс с СД выше (удельное содержание белка p53 и площадь p53-ИРМ на 38 и 43 %). В этот период в поле CA2 животных без СД выявлено некоторую депрессию антиапоптотических процессов с незначительным преобладанием проапоптотических, а на фоне СД – депрессию обоих механизмов, больше – антиапоптотического; в поле CA3 крыс без СД – сохранение активности проапоптотических процессов и углубление в динамике депрессии антиапоптотических, а в условиях СД – угнетение обоих механизмов при более существенной депрессии антиапоптотического. На 12-е сутки эксперимента в поле CA4 наблюдались наиболее сбалансированные взаимоотношения изученных процессов за счет их параллельных и однонаправленных изменений как у крыс без СД, так и с его наличием. Результаты свидетельствуют о модифицирующем влиянии СД на чувствительность полей гиппокампа к ишемически-реперфузионным повреждениям.

Ключевые слова: гиппокамп; сахарный диабет; ишемия-реперфузия головного мозга; апоптоз.

**T.M. Boychuk, O.M. Nika, S.S. Tkachuk**

### **THE RATIO OF P53-PROAPOPTOTIC AND BCL-2 ANTIAPOPTOTIC ACTIVITY IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS WITH BRAIN ISCHEMIA-REPERFUSION AND EXPERIMENTAL DIABETES**

The dynamics of the balance of indices of pro- and p53-Bcl-2 anti-apoptotic processes in the hippocampus of rats with experimental diabetes mellitus (DM) complicated by incomplete global cerebral ischemia-reperfusion was investigated. It is shown that p53 proapoptotic processes in animals without diabetes after 20 minutes of ischemia/1 hour reperfusion in all fields of the hippocampus are activated in the background of increasing Bcl-2 antiapoptotic processes in the fields CA1, CA2, CA4 and depression of it – in the CA3 field. In the early postischemic period in rats with DM activity of the p53-proapoptotic processes in fields CA1, CA3, CA4 significantly exceeds that in non-diabetic rats (area of p53-IRM increases on 110, 60 and 27 %), and was significantly

lower than that detected in CA2 field. On the 12th day of post-ischemic period, activation of apoptosis in field CA1 occurs in the background of inert antiapoptotic processes, in animals without diabetes, as well as in diabetic rats, but the indicators characterizing of apoptotic activity in rats with diabetes were higher (specific contents of p53 protein and area of p53-IRM increases on 38 and 43 %). During this period, in the CA2 region of the non-diabetic animals, some depression of the antiapoptotic processes with a slight predominance of proapoptotic processes was detected. In the field of CA3 region of rats without diabetes, the retention of activity of proapoptotic processes and the deepening in the dynamics of depression of antiapoptotic processes were showed. In rats with DM, the oppression of both mechanisms with a significant depression of antiapoptotic processes was observed. On the 12th day of experiment in the field CA4, the most balanced relationship were detected between the studied of the processes due to their parallel and unidirectional changes both in the rats without diabetes as well as with DM. The results point on the modifying effect of DM on susceptibility of hippocampal fields to ischemic-reperfusion injury.

Key words: hippocampus; diabetes mellitus; brain ischemia-reperfusion; apoptosis.

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

### **REFERENCES**

1. Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Dif.* 2009;16:899-909.
2. Luigi Titomanlio, David Fernández-Lypez, Lucilla Manganuzzi, Raffaella Moretti, Zinaida S. Vexler, and Pierre Gressens. Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models. *Pediatr Neurol.* 2015;52(6): 566-84.
3. Olmez I, Ozyurt H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int.* 2012;60(2):208-12.
4. Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, Feuerhake W. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targ.* 2013;12(5):698-714.
5. Rodriguez-Rodriguez P, Fernandez E, Almeida A, Bolanos JP. Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell Death Dif.* 2012;19:1582-89.
6. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34(Pt 2):232-37.
7. Wang Y, Dong XX, Cao Y, Liang ZQ, Han R, Wu JC, Gu ZL, Qin ZH. p53 induction contributes to excitotoxic neuronal death in rat striatum through apoptotic

- and autophagic mechanisms. *Europ J Neurosci*. 2009;30:2258-70.
8. Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, Chan PH. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome *c* and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26:7974-83.
  9. Cheng CY, Tang NY, Kao ST, Hsieh CL. Ferulic Acid Administered at Various Time Points Protects against Cerebral Infarction by Activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl-2 Anti-Apoptotic Signaling in the Subacute Phase of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155748.
  10. Li Z, Pang L, Fang F, Zhang G, Zhang J, Xie M, Wang L. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. *Brain Res*. 2012;1450:116-24.
  11. Akram Sadeghi, Javad Hami, Shahnaz Razavi, Ebrahim Esfandiary, and Zahra Hejazi. The Effect of Diabetes Mellitus on Apoptosis in Hippocampus: Cellular and Molecular Aspects. *Int J Prev Med*. 2016;7(1):57.
  12. Sun LJ, Hou XH, Xue SH, Yan F, Dai YJ, Zhao CH, Wang F, Yang RH. Fish oil modulates glycogen synthase kinase-3 signaling pathway in diabetes-induced hippocampal neurons apoptosis. *Brain Res*. 2014;1574(1):37-49.
  13. Zhao CH, Liu HQ, Cao R, Ji AL, Zhang L, Wang F, Yang RH. Effects of dietary fish oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res*. 2012;1457:33-43.
  14. Al-Rubeaan K, Al-Hussain F, Youssef AM, Subhani SN, Al-Sharqawi AH, Ibrahim HM. Ischemic Stroke and Its Risk Factors in a Registry-Based Large Cross-Sectional Diabetic Cohort in a Country Facing a Diabetes Epidemic. *J Diabetes Res*. 2016;2016:4132589. doi: 10.1155/2016/4132589.
  15. Guo L, Yu M, Zhong J, Wu H, Pan J, Gong W, Wang M, Fei F, Hu R. Stroke Risk among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Zhejiang: A Population-Based Prospective Study in China. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:6380620. doi: 10.1155/2016/6380620.
  16. Tkachuk OV. Effect of streptozotocin-induced diabetes and transient global brain ischemia on apoptosis in the thymus of rats. *Fiziol Zh*. 2011;57(6):58-64 [Ukrainian].
  17. Skibo GG. The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions. *Patologija*. 2004;1(1):22-30 [Ukrainian].
  18. 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.
  19. Kolesnik YM, Abramov AV. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement. *Microsc Analys*. 2002;5:12-16.

*Матеріал надійшов до редакції 07.09.2016*