

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВІДДАЛЕНІ НАСЛІДКИ ВПЛИВУ СТРЕСУ МАТЕРІВ У ПЕРШІЙ ТРЕТИНІ ВАГІТНОСТІ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ДОРОСЛИХ НАЩАДКІВ

Сергієнко Л. Ю.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків

Серед численних епідеміологічно-клінічних та експериментальних досліджень, результати яких полягають в основі нещодавно створеної теорії «антенатального походження неспадкових хронічних хвороб дорослих» [1, 2], особливу увагу привертають ті з них, що вказують на гестаційні витоки метаболічного синдрому (МС) та цукрового діабету (ЦД) 2 типу [3, 4]. Вказані роботи, як і багато інших, переконливо свідчать про те, що такі ознаки МС та ЦД 2 типу, як низька толерантність до глюкози, інсулінорезистентність або дефіцит продукції інсуліну можуть бути сформовані продовж фетального життя. Встановлено, що одним із основних каузальних чинників МС та ЦД 2 типу в дорослому житті є підвищення концентрації глюкокортикоїдів (ГК) у внутрішньому та зовнішньому середовищі плода, пов'язане,

частіше за все, з обмеженням харчування матері або з її стресом під час вагітності.

На сьогодні патогенетична роль надлишку ГК в організмі плода для розвитку порушень глюкозного гомеостазу в післянатальному житті не підлягає сумніву, проте багато аспектів даної проблеми потребують подальшого вивчення. Зокрема, залишається невизначеним, чи призводить надлишок ГК в оточенні плода на самих ранніх етапах його розвитку до зміни структурно-функціональних характеристик панкреатичних острівців у дорослому житті. Тому метою нашого дослідження було з'ясування особливостей гістоструктури та інсулін-продукуючої активності острівців Лянгерганса підшлункової залози статевозрілих самців щурів — нащадків матерів, стресованих на початку гестації, та визначення реакції цих утворень на додатковий стрес.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Робота проведена на 3-місячних самцях щурів популяції Вістар, отриманих від інтактних матерів або самиць, підданих дії соціально-емоційного стресу продовж першої третини вагітності.

У дослідження методом випадкових чисел було відібрано 30 статевозрілих самиць з нормальним естральним циклом, яких рандомним способом розподілили на дві однакові за кількістю групи і спарували з сексуально-активними самцями.

Самиць першої групи після встановлення першого дня вагітності [5] залишали до пологів без будь-яких експериментальних впливів, а їх нащадків, народжених природним шляхом, вважали нащадками інтактних матерів (НІМ).

Самиць другої групи піддавали впливу соціально-емоційного стресу з другої по восьму добу вагітності за методом N. C. Pratt [6], у подальшому кожну з цих самиць утримували до пологів у індивідуаль-

ній клітці. Отримані від них щурята склали групу нащадків стресованих матерів (НСМ). Харчовий та питний режим усіх самиць та їх нащадків відповідали рекомендаціям по утриманню тварин даного виду та віку [7].

Частину самців НІМ ($n=12$) та НСМ ($n=12$) знеживили у віці 90–92 доби. Інша частина тварин була піддана дії одногодинної гіпокінезії (ГпК) протягом 7 днів поспіль шляхом утримування в вузьких пластикових пеналах. Евтаназія цих щурів проведена через 12 годин після закінчення експерименту. При роботі зі щурами дотримувалися вимог етичних принципів експериментів на тваринах [8].

В зразках крові нащадків радіоімунним методом визначали концентрації кортикостерону (КС) та інсуліну за допомогою відповідних комерційних наборів.

З фіксованих та залитих у парафін підшлункових залоз були виготовлені серійні гістологічні зрізи товщиною до 3 мкм, які

зафарбовували гематоксиліном та еозином. Дослідження гістоструктури підшлункових залоз виконано за допомогою світлового мікроскопу Primo Star (Zeiss, Німеччина), обладнаного цифровою фотокамерою Canon G10 та персональним комп'ютером типу Pentium V з інстальованою програмою морфометрії гістологічних структур. Особливості мікробудови підшлункових залоз піддослідних тварин подано в описовому вигляді.

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснено методами варіаційної статистики [9]. Оскільки перевірка розподілу даних у вибірках підтвердила нормальний характер цього розподілу, показники концентрації гормонів та розміру острівців представлені як середнє арифметичне (\bar{X}) та його помилка ($S_{\bar{X}}$). Перевірку нульової гіпотези проведено на рівні значення $P < 0,05$. Вказані параметри та характеристики вираховували за допомогою пакету стандартних програм Excel-2002 [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як свідчать дані, представлені в табл., рівень КС у стані фізіологічного спокою НСМ хоча і був дещо вищим за відповідний показник у НІМ, статистично значущої різниці між цими групами не було. В той же час інсулінемія в НСМ вища, ніж у НІМ ($P < 0,05$).

Проведення ГпК дало змогу пересвідчитися в тому, що для самців НСМ 3-місячного віку притаманне зниження чутливості до дії гострого стресу (табл.). Так, після ГпК у НІМ відбувається майже дворазове зростання концентрації КС, в той час, як приріст цього показника в НСМ становить 22%. В той же час рівні концентрації інсуліну після ГпК збільшуються: в НІМ — на 55%, а у НСМ — на 65%, тобто в НСМ зростання рівня інсуліну непропорційне підвищенню рівня КС. Таке непропорційне зростання концентрації інсуліну по відношенню до підвищення рівня КС, на думку Г. Сельє, «вказує на нестабільність системи адаптаційних можливостей та захисних реакцій організму» [11].

Як відомо, роль пускового механізму каскаду нейроендокринних реакцій, через

які організм реалізує адаптацію до дії будь-якого стрес-чинника, належить катехоламінам мозку, котрі шляхом активації адренергічних механізмів гіпоталамуса стимулюють виділення КРГ. Під впливом останнього збільшується продукція АКТГ гіпофізом, що призводить до стимуляції стероїдогенезу в надниркових залозах та виходу в кров ГК [12]. Одночасно катехоламіни, стимулюючи розпад глікогену в м'язах та печінці та діючи через β -рецептори острівців Лянгерганса підшлункової залози, підсилюють продукцію інсуліну — гормону з виразними контррефектами по відношенню до катаболічної дії ГК.

Непропорційно високе зростання рівня інсуліну в НСМ при ГпК, можливо, пов'язано з двома моментами. По-перше, у НСМ загальний об'єм функціонально активних острівців Лянгерганса більший, ніж у НІМ, що формує більший пул гормону; по-друге, у НСМ має місце інсулінрезистентність з притаманним для неї гальмуванням метаболізму гормону.

Гістологічні дослідження підшлункової залози 90-денних нащадків дозволили пере-

Рівень кортикостерону та інсуліну в плазмі крові самців щурів — нащадків інтактних та гестаційно стресованих матерів

Група тварин	Кортикостерон, нмоль/л		
	n	до гіпокінезії	після гіпокінезії
НІМ	12	1400,5 ± 127,2	2663,1 ± 170,0**
НСМ	12	1776,0 ± 134,7	2158 ± 155,9**
		Інсулін, МОД/л	
НІМ	12	138,17 ± 16,04	214,18 ± 10,30**
НСМ	12	231,50 ± 18,12*	380,64 ± 16,60**

П р и м і т к а. * — статистично значущі відмінності між показниками двох груп; ** — статистично значущі відмінності між показниками однієї групи до та після гіпокінезії.

свідчитися в тому, що кількість панкреатичних острівців у перерахунку на зріз у НСМ (7 ± 2 острівців на 10 полів зору) значно більша ніж у НІМ (3 ± 1 острівець на 10 полів зору, $P < 0,05$). Звертає увагу той факт, що в пулі острівців НСМ преваюють утворення середнього ($2000\text{--}2500 \text{ мкм}^3$) (рис. 1) та малого ($300\text{--}600 \text{ мкм}^3$) розмірів. У НІМ основна маса острівців має середні та великі (площею до 5000 мкм^3) розміри (рис. 2)

Як у НІМ, так і у НСМ, гістоструктура панкреатичних острівців свідчить про високу функціональну активність цих утворень: центрально розташовані β -клітин щільно прилягають одна до одної; їх ядра округлі, займають центральну частину цитоплазми, помірно зафарбовуються гематоксиліном; за допомогою імерсії можна розгле-

діти в їх складі 1–2 ядерця; цитоплазма β -клітин злегка зерниста, слабо еозинофільна; міжклітинні простори, в яких проходять кровоносні капіляри, звужені. Підвищення функціональної активності панкреатичних острівців у НІМ внаслідок ГпК віддзеркалюється у розширенні капілярів, що проходять усередині острівців, гіперхромазії ядер та зростанні частоти їх аміотичного розподілу (рис. 3). Реакція ендокринної частини підшлункової залози НСМ на ГпК проявляється не тільки в змінах з боку мікробудови острівців, аналогічних тим, що спостерігаються в НІМ після ГпК, а і в появі великої кількості дрібних острівців, що утворилися *de novo* (рис. 4).

В літературі висловлена думка про те, що надмірне надходження ГК в організм

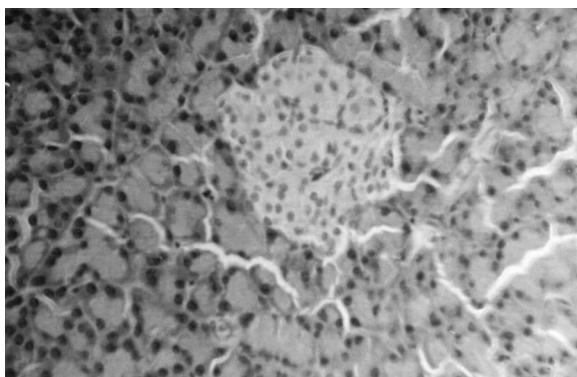


Рис. 1. Фрагмент підшлункової залози 90-денного самця щура — нащадка стресованої матері. Острівець середнього розміру.

Мікрофото. Фарбування гематоксилін-еозином, зб. $\times 300$.

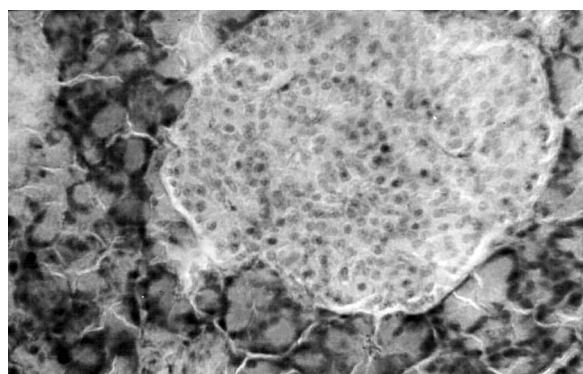


Рис. 2. Фрагмент підшлункової залози 90-денного самця щура — нащадка інтактної матері. Острівець великого розміру.

Мікрофото. Фарбування гематоксилін-еозином, зб. $\times 300$.

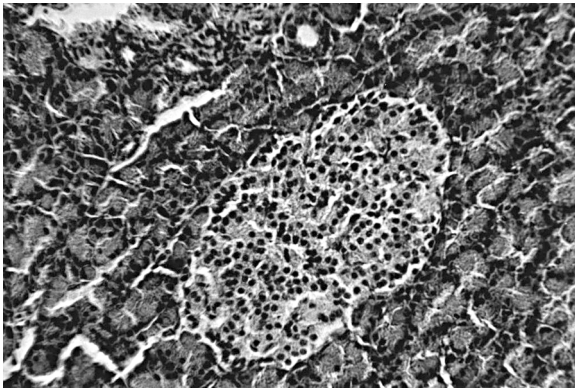


Рис. 3. Фрагмент підшлункової залози 90-денного самця щура — нащадка інтактної матері після гіпокінезії. Ознаки функціонального збудження. Мікрофото. Фарбування геметоксилін-еозином, зб. $\times 150$.

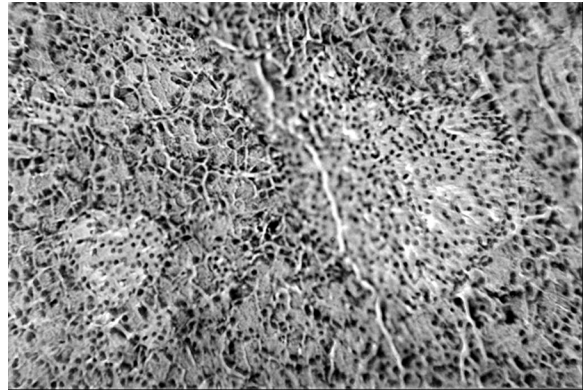


Рис. 4. Фрагмент підшлункової залози 90-денного самця щура — нащадка стресованої матері після гіпокінезії. Утворення великої кількості дрібних острівців. Мікрофото. Фарбування геметоксилін-еозином, зб. $\times 150$.

плода від матері може бути причиною пригнічення розвитку β -клітин, пов'язаного з ГК-рецепторзалежним пригніченням транскрипційного фактора Pdx-1 в клітинах фетальної підшлункової залози, а, значить, формувати функціональну недостатність інсулін-продукуючого апарату в післянатальному житті [13].

В наших дослідженнях відмічено одночасне зменшення розмірів острівців та формування великої кількості острівців *de novo* в НСМ за умов додаткового стресування, коли рівень ГК підвищується. Тим самим отримані дані вказують на збереження здатності малодиференційованих стру-

ктур клітин у складі підшлункової залози до утворення нових інсулінпродукуючих клітин під впливом КС, для якого постулюються властивості індуктора синтезу *islet neogenesis associated protein*, що стимулює проліферацію та диференціацію β -клітин [14, 15].

Безумовно, формування нових функціонально активних острівців Лянгерганса в НСМ за умов впливу екзогенних стресорів може бути джерелом додаткового інсуліну, що робить додатковий внесок до гіперінсулінемії, притаманної нащадкам гестаційно стресованих матерів.

ВИСНОВКИ

1. Соціально-емоційний стрес самиць щурів на ранніх етапах вагітності призводить до структурно-функціональних змін у ендокринному апараті підшлункових залоз їх дорослих нащадків та підвищує виразність їх реакції на стрес-індуковане зростання концентрації кортикостерону.
2. Непропорційне зростання концентрації інсуліну по відношенню до концентрації кортикостерону після гіпокінезії в нащадків гестаційно стресованих матерів вказує на значні зміни в систе-

мі адаптаційних гормонів та зниження адаптаційних можливостей організму цих тварин.

3. Отримані результати свідчать про наявність «структурно-функціонального сліду» соціально-емоційного стресу матерів на ранніх етапах гестації на рівні ендокринного апарату підшлункової залози нащадків, що відіграє патогенетичну роль у формуванні та маніфестації метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу в таких нащадків у дорослому віці.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Barker, D. J. P.* In utero programming of chronic disease [Text] / D. J. P. Barker // Clin. Science. — 1998. — Vol. 95. — P. 115–128.
2. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis [Text] / D. J. P. Barker, J. G. Eriksson, T. Forsén, C. Osmond // Int. J. Epidemiol. — 2002. — Vol. 31. — P. 1235–1239.
3. *Simmons, R. A.* Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat [Text] / R. A. Simmons, L. J. Templeton, S. J. Gertz // Diabetes. — 2001. — Vol. 50, № 10. — P. 2279–2286.
4. *Hales, C. N.* For debate: Fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure [Text] / C. N. Hales, S. E. Ozanne // Diabetologia. — 2003. — Vol. 46, № 7. — P. 1013–1019.
5. *Киршенблат, Я. Д.* Практикум по эндокринологии [Текст] / Я. Д. Киршенблат. — М.: Высшая школа, 1969. — 256 с.
6. *Pratt, N. C.* Effect of social stress during early pregnancy on litter, size, and sex ratio in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) [Text] / N. C. Pratt, R. D. Lisk // J. Reprod. Fert. — 1989. — Vol. 87. — P. 763–769.
7. *Западнюк, И. П.* Лабораторные животные [Текст] / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. И. Захария. — К.: Вища школа, 1974. — 304 с.
8. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах [Текст] / за ред. О. Г. Резнікова // Ендокринологія. — 2003. — Т. 8, № 1. — С. 142–145.
9. *Атраментова, Л. О.* Статистичні методи в біології [Текст]: підручник / Л. О. Атраментова, О. М. Утевська. — Х.: ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2007. — 288 с.
10. *Лапач, С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, Л. Н. Бабич. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
11. *Селье, Г.* Очерки об адаптационном синдроме [Текст] / Г. Селье. — М.: Медгиз, 1960. — 254 с.
12. *Науменко, Е. В.* Центральная регуляция гипоталамо-надпочечникового комплекса [Текст] / Е. В. Науменко. — Л.: Наука, Ленинградское отделение. — 1971. — 159 с.
13. Glucocorticoids suppress beta-cell development and induce hepatic metaplasia in embryonic pancreas [Text] / Chia-Ning Shen, J. R. Seckl, J. M. W. Slack, D. Tosh // Biochem. J. — 2003. — Vol. 375. — P. 41–50.
14. Beta cell proliferation and growth factor [Text] / J. H. Neilsen, C. Svensson, E. D. Carlsgaard [et al.] // J. Mol. Med. — 1999. — Vol. 77, № 1. — P. 62–66.
15. Potential role of glucocorticoid signaling in the formation of pancreatic islets in the human fetus [Text] / F. Phan-Hug, F. Guimiot, V. Lelièvre [et al.] // Pediatr. Res. — 2008. — Vol. 64, № 4. — P. 346–351.

ВІДДАЛЕНІ НАСЛІДКИ ВПЛИВУ СТРЕСУ МАТЕРІВ У ПЕРШІЙ ТРЕТИНІ ВАГІТНОСТІ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ДОРОСЛИХ НАЩАДКІВ

Сергієнко Л. Ю.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данчлевського НАМН України», м. Харків

Проведено порівняльне вивчення рівня кортикостерону, гістоструктури та інсулінпродукуючої функції панкреатичних острівців у статевозрілих самців-щурів — нащадків інтактних та гестаційно стресованих матерів, у базальному стані та після гіпокінезії. Встановлено, що в стані фізіологічного спокою концентрація інсуліну в нащадків стресованих матерів вища, ніж у інтактних щурів. Для даної групи тварин характерне також непропорційне зростання концентрації глюкокортикоїдів підвищення рівня інсуліну, що розцінено як нестабільність у системі гормональної адаптації. Шляхом гістологічних досліджень панкреатичних острівців визначено зростання кількості острівців у нащадків стресованих матерів при одночасному зменшенні їх розмірів. Стрес гіпокінезії призводить до активного новоутворення острівців та підвищення рівня інсуліну в плазмі крові стресованих нащадків. «Структурно-функціональний слід» гестаційного стресу матерів на рівні панкреатичних острівців нащадків розглядається як передумова розвитку в останніх метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу.

К л ю ч о в і с л о в а: гестаційний стрес, нащадки, підшлункова залоза.

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ВЛИЯНИЯ СТРЕССА МАТЕРЕЙ В ПЕРВОЙ ТРЕТИ БЕРЕМЕННОСТИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ВЗРОСЛЫХ ПОТОМКОВ

Сергиенко Л. Ю.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков

Выполнено сравнительно изучение уровня кортикостерона, инсулина и гистоструктуры поджелудочных желез у половозрелых самцов крыс — потомков интактных и гестационно стрессированных матерей, в состоянии покоя и после гипокинезии. Показано, что в состоянии физиологического покоя концентрация инсулина у потомков стрессированных матерей выше, чем у интактных. Для данной группы животных характерен непропорциональный возрастанию концентрации глюкокортикоидов подъем уровня инсулина при гипокинезии, что указывает на нестабильность системы гормональной адаптации. Гистологические исследования показали увеличение количества панкреатических островков у потомков стрессированных матерей при одновременном уменьшении их размеров. Стресс гипокинезии индуцирует новообразование островков и повышение уровня инсулина в плазме крови стрессированных потомков. «Структурно-функциональный след» гестационного стресса матерей на уровне поджелудочной железы потомков служит предпосылкой для развития у последних метаболического синдрома и сахарного диабета 2 типа.

К л ю ч е в ы е с л о в а: гестационный стресс, потомки, поджелудочная железа.

LONG-TERM EFFECTS OF MOTHERS STRESS IN THE FIRST THIRD OF PREGNANCY ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PANCREAS IN ADULT OFFSPRINGS

L. Yu. Sergienko

SI «V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv

A comparative study of the levels of corticosterone, histostructure insulin-produced and function of pancreatic islets in adult male rats — offsprings of intact and gestational-stressed mothers in the basal state and after hypokinesia was conducted. Found that in a state of physiological rest concentration of insulin in the offspring of stressed mothers higher than in intact rats. For this group of animals is characterized disproportionate increase in insulin levels increased towards to concentrations of glucocorticoids that regarded as instability of adaptation. By histological studies of pancreatic islets shown the increasing number of islets in the offspring of stressed-mothers while reducing their size. Stress of hypokinesia leads to active formation of new islets and increased insulin levels in the blood plasma stressed offsprings. “Structural and functional consequence” of gestational maternal stress on level of pancreatic islets offsprings considered as a predisposition for the development of the metabolic syndrome and type 2 diabetes.

K e y w o r d s: gestational stress, offsprings, pancreas.