



Т.А. Грекова

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭНДОКРИННОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ САМЦОВ КРЫС В ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКЕ

Запорожский государственный медицинский университет

Ключові слова: панкреатичні островці, гестаційний діабет, інсулін, глюкагон, соматостатин, амелін.

Ключевые слова: панкреатические островки, гестационный диабет, инсулин, глюкагон, соматостатин, амилин.

Key words: pancreatic islets, gestational diabetes, insulin, glucagon, somatostatin, amylin.

У статті наведено морфофункціональний аналіз гормонпродуруючих клітин панкреатичних островців самців шурів – нащадків самок з експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД) у віковому аспекті.

В статье представлен морфофункциональный анализ гормонпродуцирующих клеток панкреатических островков самцов крыс – потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД) в возрастном аспекте.

The article presents a morphological and functional analysis of pancreatic islets hormone-producing cells of male rats – the descendants of females with experimental gestational diabetes (EHD) in the age aspect.

Установлено, что в поздние сроки нормально протекающей беременности развивается инсулинорезистентность [8]. При этом, эугликемия в организме матери поддерживается компенсаторным увеличением секреции инсулина [9]. Следовательно, функциональная недостаточность бета-эндокриноцитов компенсаторно усиливает секрецию инсулина является ключевым фактором развития гестационного диабета [7]. Связанное с этим внутриутробное воздействие гипергликемии на плод является фактором риска развития таких патологических состояний, как ожирение, нарушение толерантности к глюкозе, инсулинорезистентность и др. у взрослых потомков [8,9,13]. На сегодня известны основные проявления последствий перенесенной внутриутробной гипергликемии и некоторые механизмы их развития. При этом, большинство исследователей во главу угла ставят формирующуюся при этом дисфункцию только бета-клеток, а возможная патогенетическая роль альфа-, дельта- и амилин-синтезирующих клеток остается не изученной. Отсутствие данных о состоянии панкреатических островков и эндокриноцитов различного типа в их составе диктует необходимость комплексного изучения островковой клеточной композиции.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Комплексное морфофункциональное изучение клеток панкреатических островков, продуцирующих инсулин, глюкагон, соматостатин и амилин, у потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД) линии Wistar в возрастной динамике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все выполненные процедуры над животными соответствовали национальным «Общим этическим принципам экспериментов на животных» (Украина, 2001) и положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) [2]. ЭГД моделировали на 40 самках крыс линии Wistar массой 250–270 г в эугликемическом со-

стоянии (концентрация глюкозы крови менее 6,5 ммоль/л) с устойчивым эстральным циклом, определенным согласно «Методическим рекомендациям» Фармакологического центра при МЗ Украины [3]. На 15 сутки беременности, что соответствует последнему триместру, самкам однократно интраперитонеально вводили стрептозотоцин в дозе 45 мг/кг, растворенный в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5) [1]. Контрольная группа состояла из 10 беременных самок, которым вводили 0,5 мл цитратного буфера. На 5-ые сутки после индукции диабета натощак определяли уровень глюкозы крови из хвостовой вены глюкозооксидазным методом. В эксперимент отбирали самок с концентрацией глюкозы крови более 6,5 ммоль/л, при этом в группе экспериментальных самок ее среднее значение было $12,26 \pm 0,45$ ммоль/л. У самок с контрольным ведением цитратного буфера сохранялась эугликемия ($3,89 \pm 0,03$ ммоль/л). Исследование проведено на 60 самцах-потомках крыс линии Wistar. Экспериментальная группа состояла из 30 потомков самок с сахарным диабетом, контрольная группа – из 30 одновозрастных потомков самок с нормально протекавшей беременностью. При достижении 1, 7 и 18 месяцев животных выводили из эксперимента после 12-часового голодания, одномоментно декапитировали под наркозом (этаминал натрия 40 мг/кг внутрибрюшинно) и отбирали кровь для биохимических исследований. Иммуногистохимические и морфометрические исследования поджелудочной железы описаны нами ранее [4]. Эндокриноциты идентифицировались методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием наборов для выявления гормонов в тканях производства Peninsula Laboratories Inc., США (инсулин, соматостатин, амилин) и SIGMA Chemical, США (глюкагон). Визуализированный под микроскопом Axioskop (Zeiss, Германия) с флюоресцентной приставкой (Zeiss, Германия) объект посредством видеокамеры СОНУ-4922 (СОНУ Inc., США) вводился в компьютерную систему цифрово-



го анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Статистическая обработка полученных данных выполнена в программе STATISTICA 6.0. (Stat Soft, USA) однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с помощью поправки Бонферрони [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обращало внимание, что масса тела потомков самок с ЭГД в 1 месяц составляла $93,80 \pm 4,75$ г, а в 7 месяцев – $383,4 \pm 8,27$ г, что было соответственно в 2 и 1,5 раза больше, чем у потомков самок с нормально протекавшей беременностью. Но в 18 месяцев их масса не отличалась от таковой одновозрастных животных контрольной группы. При выведении из эксперимента у 18-месячных потомков самок с ЭГД регистрировалась гипергликемия ($8,65 \pm 0,24$ ммоль/л), в отличие от контрольных такого же возраста, у которых концентрация глюкозы крови была $4,36 \pm 0,15$ ммоль/л.

Известно, что к концу 1-го месяца жизни животных завершается первый этап морфогенеза панкреатических островков, суть которого заключается в формировании бета-клеток взрослого типа и апоптозе эмбриональных [10-12,14,15]. Согласно полученным нами [4] и литературным данным [6,10,11], эта фаза ремоделинга характеризуется высоким процентным содержанием маленьких островков, а ее физиологическое значение состоит в подготовке бета-клеток к метаболическим потребностям организма при переходе с молочного на смешанный тип питания. Как и в предыдущей работе [4], с помощью математического классификационного анализа все идентифицированные островки по площади мы разделили на 4 типа. Это дало возможность установить, что в поджелудочной железе 1-месячных животных группы ЭГД процентное содержание маленьких островков было в 2 раза меньше ($p < 0,05$), чем в контроле (табл. 1). Возмож-

ших островков было в 2,8 и 2,5 раза ($p < 0,05$) соответственно больше, чем у контрольных. Отметим, что у 18-месячных потомков самок с ЭГД гигантских островков было меньше (2%), чем у животных контрольной группы (7%).

Средняя площадь всех идентифицированных панкреатических островков у животных экспериментальной модели ЭГД в 1-ый месяц жизни составляла 2044 ± 106 мкм², в 7 месяцев – 2663 ± 158 мкм² и была на 70% и 24% ($p < 0,05$) соответственно больше, сравнительно с интактными такого же возраста. У 18-месячных животных среднее значение этого показателя составляло 2316 ± 132 мкм², что было на 23% ($p < 0,05$) меньше, чем у одновозрастных интактных животных. У контрольных самцов наблюдалось прогрессивное увеличение показателей средней площади островков с возрастом, которые составляли 1191 ± 75 мкм², 2137 ± 135 мкм² и 3018 ± 162 мкм² в 1, 7 и 18 месяцев жизни соответственно.

Следующим этапом исследования было определение количества и размеров эндокриноцитов, поскольку именно от этих параметров зависит величина средней площади островков. Нами установлено, что у 1-месячных потомков самок с ЭГД количество и площадь бета-эндокриноцитов были больше, в сравнении с одновозрастными интактными самцами (табл. 2). У 7-и 18-месячных экспериментальных самцов количество бета-клеток, наоборот, было меньше, чем в контроле. Вместе с этим, площадь этих клеток у 7-месячных самцов группы ЭГД была больше, чем у интактных, но в 18 месяцев уменьшалась на 12% ($p < 0,05$) и была меньше, чем у одновозрастных контрольных. При этом, в группе сравнения мы наблюдали увеличение среднего значения площади бета-клеток с возрастом. В сопоставлении с потомками одновозрастных интактных самок, в островках 1- и 18-месячных опытных животных количество альфа-клеток было больше, причем у последних в 2,5 раза ($p < 0,05$). Площадь альфа-эндокриноцитов у самцов группы ЭГД в 18 месяцев была на 12% ($p < 0,05$) меньше, чем в 7 месяцев, хотя и превышала контрольные показатели во все изучаемые периоды жизни животных. Среднее количество дельта-клеток у 1-месячных экспериментальных самцов не отличалось, а у 7- и 18-месячных было в 2 раза ($p < 0,05$) больше, чем у интактных такого же возраста. Площадь этих клеток у 7 и 18-месячных потомков самок с ЭГД, так же, как и у потомков интактных самок, была больше, чем у 1-месячных. Значение этого показателя во все изучаемые сроки жизни экспериментальных животных было на 25% ($p < 0,05$) меньше, чем у одновозрастных контрольных. Стоит обратить внимание на меньшее количество амилинсинтезирующих клеток у 1- и 7-месячных потомков самок с ЭГД при одинаковой с потомками интактных самок их площади. Но, по сравнению с 7-месячными животными этой группы, в 18 месяцев количество этих клеток возрастало в 2 раза ($p < 0,05$).

На следующем этапе изучалась биосинтетическая функция эндокриноцитов, о которой мы косвенно судили по параметрам концентрации и содержания гормонов. Установили, что концентрация инсулина в островках потомков самок с ЭГД во все изучаемые нами возрастные периоды была меньше, по сравнению с потомками самок с нормально

Таблица 1

Процентное соотношение типов панкреатических островков у потомков самок с ЭГД и контрольных животных в возрастной динамике

Серии исследований		Типы островков, %			
		маленькие	средние	большие	гигантские
1 мес.	контроль	80	16	4	-
	ГД	44	45	10	1
7 мес.	контроль	51	31	15	3
	ГД	43	27	27	3
18 мес.	контроль	37	29	27	7
	ГД	37	44	17	2

ная причина обнаруженных отличий может заключаться в более интенсивной репликации бета-клеток у животных под влиянием внутриутробной гипергликемии, что влечет за собой быстрый рост площади островков, как следствие, они выпадают из категории маленьких. Действительно, у 1-месячных экспериментальных животных средних и боль-

Морфофункциональные параметры эндокриноцитов (M±m)

Возраст и группы животных		1 месяц		7 месяцев		18 месяцев	
		ЭГД	контроль	ЭГД	контроль	ЭГД	контроль
Бета-клетки	Количество клеток	15±1 ⁽¹⁾	12±1	17±1 ⁽²⁾	23±2 ⁽¹⁾	19±1 ^(3, 1*)	28±2 ^(1,2)
	Площадь, мкм ²	66,77±0,48 ⁽¹⁾	58,27±0,55	66,96±0,49 ⁽²⁾	58,83±0,29	56,25±0,40 ^(3,1*,2*)	62,61±0,40 ^(1,2)
	Конц-ция инсулина, E _{ИФ}	0,228±0,007	0,232±0,008	0,197±0,007 ^(1*,2)	0,220±0,007	0,237±0,009 ^(2*,3)	0,274±0,008
	Содержание инсулина, E _{ИФ}	168,77±8,99 ⁽¹⁾	267,77±26,92	177,73±8,90 ⁽²⁾	410,24±57,61	215,66±15,27 ^(1*,3)	507,42±46,93 ⁽¹⁾
Альфа-клетки	Количество клеток	14±1 ⁽¹⁾	12±1	9±1 ^(1*)	10±1	17±1 ^(2*,3)	7±0 ^(1,2)
	Площадь, мкм ²	52,43±0,35	51,66±0,34	62,40±0,62 ^(1,1*)	50,36±0,35	55,15±0,45 ^(3,2*)	52,19±0,26
	Конц-ция глюкагона, E _{ИФ}	0,018±0,001	0,017±0,001	0,022±0,001 ^(1*,2)	0,018±0,001	0,016±0,001 ^(2*,3)	0,042±0,002 ⁽²⁾
	Содержание глюкагона, E _{ИФ}	17,75±2,34 ⁽¹⁾	9,24±0,86	12,53±1,31 ⁽²⁾	7,60±0,56	15,65±1,72	14,69±1,07 ⁽²⁾
Дельта-клетки	Количество клеток	8±1	8±1	10±1 ⁽²⁾	5±0 ⁽¹⁾	8±1 ⁽³⁾	4±0 ⁽¹⁾
	Площадь, мкм ²	53,19±0,66 ⁽¹⁾	70,62±2,54	60,76±0,80 ^(2,1*)	82,79±2,87 ⁽¹⁾	62,83±0,80 ^(3,1*)	87,81±4,67
	Конц-ция соматостатина, E _{ИФ}	0,027±0,002 ⁽¹⁾	0,031±0,002	0,022±0,002	0,022±0,001 ⁽¹⁾	0,023±0,001	0,021±0,001 ⁽¹⁾
	Содержание соматостатина, E _{ИФ}	7,68±0,57 ⁽¹⁾	9,76±1,20	10,95±1,14 ^(1*)	12,04±0,88 ⁽¹⁾	10,21±0,84 ^(1*)	9,65±0,61 ⁽²⁾
Амилинсинтезирующие	Количество клеток	7±1 ⁽¹⁾	11±1	5±1 ⁽²⁾	13±1	10±1 ^(3,2*)	9±1
	Площадь, мкм ²	48,91±0,28	47,42±1,03	56,79±0,36 ^(1*)	58,67±1,15	56,17±0,17 ^(3,1*)	51,71±2,45
	Конц-ция амилина, E _{ИФ}	0,209±0,011	0,316±0,013	0,282±0,010 ⁽¹⁾	0,178±0,008 ⁽¹⁾	0,276±0,011 ⁽¹⁾	0,229±0,005 ⁽²⁾
	Содержание амилина, E _{ИФ}	473,59±29,41 ⁽¹⁾	638,14±36,72	499,47±35,89 ⁽²⁾	750,09±63,04	464,79±29,08 ⁽³⁾	588,33±49,20

Примечание: достоверность отличий p<0,05 по отношению к контролю 1 мес. (1), 7 мес. (2), 18 мес. (3); по отношению к 1-(1*) и 7-месячным (2*) потомкам самок с ЭГД.

протекавшей беременностью (табл. 2). Содержание инсулина в островках экспериментальных животных имело тенденцию к нарастанию с возрастом, тем не менее, значение этого показателя было меньше в каждый из изучаемых возрастных периодов, по сравнению с интактными животными такого же возраста (табл. 2). Концентрация глюкагона у самцов с ЭГД в 7 месяцев превышала, а в 18 месяцев была меньше контрольных показателей. Содержание глюкагона в островках животных с ЭГД в 1 и 7 месяцев было выше, чем у интактных. Концентрация и содержание соматостатина с возрастом экспериментальных животных не изменялись и были статистически значимо меньше контрольных показателей только у 1-месячных животных. Концентрация амилина у животных с ЭГД в 1 месяц была на 32% (p<0,05) меньше, а в 7 и 18 месяцев – на 53% и 30% (p<0,05) соответственно больше, чем у интактных. Содержание амилина, как и инсулина, в островках животных экспериментальной

группы, по сравнению с одновозрастными интактными, было ниже в 1-ый, 7-ой и 18-ый месяц жизни на 26%, 33% и 21% (p<0,05) соответственно.

В завершение, отметим полученные нами результаты исследования, которые мы относим к числу наиболее важных. У потомков самок с ЭГД нарушение морфогенеза панкреатических островков проявлялось в низком процентном содержании маленьких и отсутствии прогрессирующего с возрастом увеличения их средней площади. Установленная нами гипергликемия у этих животных в возрасте 18 месяцев, вероятнее всего, развивалась вследствие истощения биосинтетической функции и уменьшения количества и площади бета-клеток. Эти изменения мы связываем с чрезмерной стимуляцией бета-эндокриноцитов в условиях хронической пренатальной гипергликемии и постнатальной избыточной массы тела. На основании обнаружения меньшего количества амилинсинтезирующих клеток у экспериментальных



животных раннего возраста и половозрелых, можно предполагать, что пренатальное воздействие гипергликемии нарушает дифференцировку этих клеток, обуславливая их меньшее количество к моменту рождения, а с возрастом развивается их компенсаторная гиперплазия, гипертрофия и гиперфункция как проявления агонистического действия инсулина. При этом, существенно возросшее количество альфа-клеток у 18-месячных потомков самок с ЭГД при наименьшей концентрации глюкозагона, возможно, являлось следствием активации синтеза амилина и вовлечения части этих клеток в этот процесс. Функциональные параметры дельта-эндокриноцитов, хотя и оставались стабильными, увеличенное их количество с периода половой зрелости у потомков самок с ЭГД могло быть вызвано необходимостью статического влияния соматостатина на секрецию глюкозагона, содержание которого в островках было выше контрольных значений во все изучаемые нами периоды.

ВЫВОДЫ

Оценка результатов проведенного комплексного исследования позволяет заключить, что развитие гипергликемии у взрослых потомков самок с ЭГД обусловлено не только качественными и количественными изменениями главных сенсоров концентрации глюкозы крови – бета-клеток, но и выявленными нами особенностями морфофункционального состояния альфа-, дельта- и амилинсинтезирующих клеток. Своевременная коррекция дисбаланса островковых гормонов может быть первым шагом на пути преодоления развития метаболических нарушений у лиц с установленным пренатальным фактором риска – внутриутробной гипергликемией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. № 17281 Україна. Спосіб моделювання гестаційного діабету у щурів лінії Вістар для вивчення його наслідків для нащадків / Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Беленічев І.Ф., Ганчева О.В., Камішиний А.М., Грекова Т.А.; опубл. 15.09.2006, Бюл. №9.
2. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях – Страсбург, 18 марта 1986 г.
3. Йен С. Репродуктивная эндокринология: В 2 т. / С.К. Йен, Р.Б. Джаффе. – Т. 2. – М.: Медицина. – 1998.
4. Колесник Ю. Морфофункциональное состояние островков Лангерганса интактных самцов крыс линии Wistar в возрастном аспекте / Ю.М. Колесник, Т.А. Грекова // Патология. – 2009. – Т. 6, № 2. – С. 73–78.
5. Реброва О. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю.Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002.
6. Bouwens L. Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass / L. Bouwens, I. Rooman // Physiol. Rev. – 2005. – Vol. 85. – P. 1255–1270.
7. Catalano P.M. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes / P.M. Catalano, E.D. Tyzbir, R.R. Wolfe et al. // AJP Endocrinology and Metabolism. – 1993. – Vol. 264, Issue 1. – P. 60–67.
8. Catalano P.M. Gestational Diabetes and Insulin Resistance: Role in Short- and Long-Term Implications for Mother and Fetus / P.M. Catalano, J.P. Kirwan, S. Mouzonz et al. // J. Nutr. – 2003. – Vol. 133, № 5, (Suppl. 2). – P. 1674S–1683S.
9. Cheung N.W. The management of gestational diabetes / N.W. Cheung // Vascular Health and Risk Management. – 2009. – Vol. 5. – P. 153–164.
10. Ezenwaka C.E. Early metabolic defects for developing diabetes mellitus among offspring of patients with type 2 diabetes are independent of gender / C.E. Ezenwaka, N.V. Offiah, G. Davis // West Indian Med. J. – 2000. – Vol. 49, (Suppl. 4). – P. 276–280.
11. Huang H.P. Transcription factors involved in pancreatic islet development / H.P. Huang, M.J. Tsai // J. Biomed. Sci. – 2000. – Vol. 7, № 1. – P. 27–34.
12. Inuwa I. Correlation between volume fraction and volume weight between volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats / I. Inuwa, S.J. El Mardi // Anat. – 2005. – Vol. 206. – P. 185–192.
13. Junghyo J. Size Distribution of Mouse Langerhans Islets / J. Junghyo, Y. Ch.Moo et al. // Biophysical Journal. – 2007. – Vol. 93. – P. 2655–2666.
14. Kairamkonda Ch.V. Amylin peptide levels are raised in infants of diabetic mothers / Ch.V. Kairamkonda, A. Deorukhkar, R. Coombs et al. // Arch. Dis. – 2005. – Vol. 90. – P. 1279–1282.
15. Metzger B.E. Overview of GDM. Accomplishments of the last decade challenges for the future / B.E Metzger // Diabetes. – 1991. – Vol. 40, (Suppl. 2). – P. 1–2.

Сведения об авторе:

Грекова Т.А., аспирант каф. патофизиологии ЗГМУ.

Адрес для переписки:

69035, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26, ЗГМУ, кафедра патофизиологии.

Тел.: (0612) 34-35-61, 097-938-61-64.

E-mail: snezhenka@list.ru