

ЦИТОКИНЫ, МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ ПРИ НАРУШЕНИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС И ИХ ПОТОМСТВА ВСЛЕДСТВИЕ ГИПОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ

Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)

Данная работа является фрагментом НИР «Патогенез впливу екзогенних шкідливих факторів на морфофункціональний стан підшлункової залози», №гос. реєстрації 012U002381.

Вступление. Заболевания поджелудочной железы (ПЖ) занимают значительное место в структуре заболеваемости детей и взрослых. ПЖ – это орган, который благодаря сочетанию внешнесекреторной и эндокринной функций участвует во многих физиологических процессах. Анатомические особенности расположения ПЖ и сложность регуляции функций создают трудности в диагностики различных ее патологических состояний [1]. Известно, что обязательным компонентом системного ответа организма на воздействие практически любого «чрезвычайного раздражителя» (каким может явиться нарушение питания, особенно во время беременности), приводящего к патогенетически значимому повреждению тканей, являются нейрогормональная стресс-реакция, обусловленная активацией «системы гипофиз-надпочечники» и симпатической нервной системы и системный гуморальный ответ, основу которого составляет активация экспрессии и повышение содержания в крови различных биологически активных веществ, прежде всего цитокинов [2]. Кроме того, дисбаланс макро- и микроэлементов, возникший в условиях несбалансированного питания может способствовать развитию патологии ПЖ [6].

Целью исследования явилось уточнение патогенеза повреждения ПЖ при действии неблагоприятных факторов на систему мать-плод, путём изучения особенностей морфофункционального состояния ПЖ, уровня цитокинов, макро- и микроэлементов при гипокалорийной диете у беременных крыс и их потомства.

Объект и методы исследования. При выполнении исследования использована экспериментальная модель, разработанная автором [4]. Изучены морфофункциональные изменения ПЖ беременных крыс и их потомства популяции WAG/G Sto с использованием гистологического, цитохимического и

цитоморфометрического методов. Для оценки цитокинов в сыворотке крови иммуноферментным методом по прилагаемым инструкциям определялись ИЛ-4 с помощью набора реагентов фирмы Вектор БЕСТ (Новосибирск), ИЛ-12 с помощью набора реагентов фирмы Ani Biotech Oy (Elisa Kit), Orgenium laboratories Business Unit, Finland. В гомогенате ткани ПЖ спектрофотометрическим методом по прилагаемым инструкциям определялись цинк с помощью набора реагентов фирмы Spectromed (Молдова), магний и кальций с помощью наборов реагентов фирмы «Филист-Диагностика» (Днепропетровск).

Все группы экспериментальных животных включали 10 голов. Основные группы: беременные крысы (1 гр.) и их потомство – новорождённые крысята (гр. 1. 1), 1-месячные крысята (гр. 1. 2), 2-месячные крысята (гр. 1. 3). Группу сравнения составили животные, получившие сбалансированное питание, и их потомство аналогичного возраста. Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001). Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы Microsoft Excel-2003, компьютерной программы Biostat. exe-2008 с использованием однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты исследований и их обсуждение. У 100% крыс основной группы (1-й) по сравнению с животными группы сравнения наблюдается уменьшение объёма паренхимы (на 8,7%, $p < 0,001$), увеличение объёма стромальной части ПЖ (на 23,3%, $p < 0,001$) и существенное снижение средней площади ацинусов (на 20,1%, $p < 0,001$) гипопанкреатизма.

У новорождённых крысят (гр. 1. 1) степень выраженности изменений ПЖ больше, чем у матерей: относительный объём паренхимы уменьшен на 18,5% ($p < 0,05$), относительный объём стромы увеличен на 41,4% ($p < 0,05$); однако средняя площадь ацинусов

уменьшена менее существенно (на 7,7%). За два месяца жизни крысят основных групп произошло увеличение относительного объёма паренхимы на 6% и площади ацинусов на 2,4%, что меньше аналогичных показателей у крысят групп сравнения.

При микроскопическом исследовании ПЖ крыс, обнаружен меж- и внутريدольковый фиброз (у 80%±12,6, $p < 0,001$), липоматоз и отёк стромы (у 80%±12,6, $p < 0,001$), умеренно выраженная воспалительная инфильтрация (у 40%±15,5), дистрофические изменения ядер, активизация процесса апоптоза ациноцитов (у 100%). У новорождённых крысят помимо указанных выше изменений ПЖ крыс-матерей, незрелость стромы (у 100%), полнокровие капилляров (у 100%) и дистрофия цитоплазмы экзокриноцитов (у 100%). По мере роста крысят большинство из указанных морфологических изменений ПЖ сохраняются до 2-месячного возраста.

У крыс-матерей установлена морфофункциональная перестройка эндокринного аппарата ПЖ, заключающаяся в уменьшении площади ОЛ (в среднем на 25,3%, $p < 0,001$), уменьшении β - и α -клеток в ОЛ (на 27,3% и 28% соответственно, $p < 0,001$). У новорождённых крысят наблюдаются аналогичные изменения, но степень их выраженности несколько меньше. Однако по мере роста крысят указанные нарушения прогрессируют и к 2-месячному возрасту площадь ОЛ, количество β - и α -клеток составляет соответственно 48,7%, 69,4% и 68,5% ($p < 0,001$) от нормы.

При микроскопическом исследовании ПЖ у 100% крыс основной группы имелось уменьшение количества ОЛ, местами их гипертрофия, уменьшение размеров и дегенеративные изменения ядер α - и β -клеток, дистрофия их цитоплазмы, усиление апоптоза. У новорождённых крысят кроме этого имеются ОЛ неправильной и лентовидной формы, но и апоптоз отсутствует. Однако в течение дальнейшей жизни у крысят отмечается отрицательная: прогрессивно уменьшается количество гипертрофированных ОЛ на фоне выраженного доминирования мелких.

Таким образом, влияние гипокалорийной диеты на организм крыс до и в период беременности оказывает повреждающее действие на экзо- и эндокринный аппарат не только их собственной ПЖ, но и ПЖ плодов.

С учётом того, что обнаруженные у крысят морфологические изменения ПЖ имеют стойкий характер без существенной положительной динамики в течение 2-х месяцев жизни, представляется важным выяснение участия иммунных механизмов в повреждении ПЖ и состояния баланса макро- и микроэлементов, поскольку его нарушения могут вносить негативный вклад в поддержание функциональных и морфологических изменений ПЖ. С этой

целью был исследован уровень в сыворотке интерлейкинов 12 и 4 (ИЛ-12, ИЛ-4), а так же содержание в гомогенате ткани ПЖ кальция, магния и цинка. Из множества про- и противовоспалительных цитокинов мы выбрали ИЛ-12 и ИЛ-4 так как они определяют направление дифференцировки Т-лимфоцитов из CD4⁺-Т-клеток с образованием Т-хелперов 1-го (Th1) и 2-го (Th2) типов [7], т. е. являются маркерными цитокинами Th1- и Th2-лимфоцитов. Их уровень позволяет судить о пути реализации иммунного ответа на повреждение тканей, поскольку известно, что Th1-клетки опосредуют реакции клеточного иммунитета, основанные на взаимодействии антиген-Т-лимфоцит, а Th2 клетки – реакции гуморального иммунного ответа, связанного со стимуляцией В-лимфоцитов и выработкой антител [5].

Результаты исследования содержания цитокинов и микроэлементов представлены в **таблице**. Установлено, что у крыс-матерей и 2-месячных крысят имеется существенное повышение содержания ИЛ-12 (в 1,8 и 1,6 раза соответственно) и снижение ИЛ-4 (в 2,4 и 3,5 раз соответственно). У 1-месячных крысят, в отличие, от животных других групп, имеется снижение уровней ИЛ-12 (в 1,8 раза) и ИЛ-4 (в 3,9 раза), что свидетельствует о недостаточности иммунного ответа на повреждение ткани ПЖ. Соотношение ИЛ-12 / ИЛ-4 у крыс матерей составляет 22,5 (в группе сравнения 5,0), у 1-месячных крысят – 13,5 (в группе сравнения 6,3), у 2-месячных крысят – 22,1 (в группе сравнения 4,1). Это свидетельствует о том, что наиболее выраженный цитокиновый дисбаланс имеет место у крыс-матерей, наименее выраженный – у 1-месячных крысят.

Таким образом, результаты исследования манифестируют наличие у животных системного гуморального ответа в виде дисбаланса противо- и провоспалительных цитокинов с преобладанием маркерного цитокина Th1-лимфоцитов (ИЛ-12), что отражает преимущественное вовлечение в патогенез повреждения ПЖ клеточного звена иммунитета. У части животных (40%) уже на момент

Таблица

Содержание цитокинов в сыворотки крови и микроэлементов в гомогенате ткани поджелудочной железы (M±m) у крыс-матерей 2-й группы и их потомства (в % от норматива)

Показатели	Крысы-матери (гр. 1)	Возраст крысят	
		1 месяц (гр. 1. 2)	2 месяца (гр. 1. 3)
ИЛ-12 (%)	186,6±9,1***	55±1,5***	156±3,3*** ($p_2 < 0,001$)
ИЛ-4 (%)	45,4±6***	25,6±3,4***	28,7±2,4*** ($p_2 = 0,466$)
Кальций (%)	120,9±2,6**	55,6±0,6***	82,4±0,7*** ($p_2 < 0,001$)
Магний (%)	91,2±3	86±1***	71±1,4*** ($p_2 < 0,001$)
Цинк (%)	55,7±1,8***	71,3±0,7***	93,6±0,4*** ($p_2 < 0,001$)

Примечание: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (сравнение с группой контроля); p_2 – сравнение с гр. 2. 1

исследования мы обнаружили морфологические признаки воспаления в ПЖ. Это свидетельствует, во-первых, о значимости имеющегося у животных цитокинового дисбаланса в патогенезе повреждения ПЖ и развития в ней хронического воспалительного процесса и, во-вторых, о риске возникновения хронического панкреатита у остальных животных в связи с длительно сохраняющейся иммунопатологической реакцией (специфической аллергической реакцией замедленного типа).

Исследование уровня макро- и микроэлементов в гомогенате ткани ПЖ показало, что у 100% крыс-матерей имеется повышение уровня кальция на 20,9%. Уровень магния снижен у 50% крыс (у 20% нормальный его уровень, у 30% – повышенный), при этом среднее значение показателя практически не отличается от такового у животных группы сравнения. Уровень цинка снижен (в среднем на 44,7%) у 100% животных (табл.).

У всех крысят обеих групп, в отличие от их матерей, наблюдается существенное снижение уровня кальция, а изменения содержания магния и цинка такие же, как у матерей, но степень их выраженности меньше (табл.). Полученные данные свидетельствуют о том, что при повреждении ПЖ, вызванном влиянием гипокалорийной диеты, морфологические изменения её сочетаются с дисбалансом макроэлементов (кальция и магния) и снижением уровня цинка. Это, безусловно, негативно сказывается на внутриклеточном метаболизме панкреатитов, их экзо- и эндокринной секреторной активности, что может ещё больше усугубить повреждение ПЖ и способствовать развитию воспаления и панкреатической недостаточности [3].

Выводы.

1. У всех беременных крыс, получавших гипокалорийную диету, и у их потомства наблюдаются морфофункциональные изменения ПЖ стереотипного характера, проявляющиеся сочетанием дистрофических и некробиотических, атрофических

и склеротических изменений, а также усилением апоптоза в специализированных клетках ПЖ.

2. У животных всех экспериментальных групп выражен системный гуморальный ответ в виде дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов с преобладанием маркерного цитокина Th1-лимфоцитов (ИЛ-12). Это свидетельствует о преимущественном вовлечении в патогенез повреждения ПЖ клеточного звена иммунитета.

3. У животных всех групп имеет место дисбаланс макро- и микроэлементов в ткани ПЖ (гиперили гипокальциемия, гипомагниемия, снижение содержания цинка), который может усугублять нарушения метаболизма панкреатитов, возникшие вследствие гормонально-субстратных нарушений при гипокалорийной диете.

4. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что гипокалорийная диета беременных крыс является существенным фактором риска развития органической патологии ПЖ с секреторной недостаточностью не только у них самих, но и у их потомства.

Перспективы дальнейших исследований. Результаты исследования свидетельствуют о перспективности дальнейших научных разработок в данном направлении, поскольку на сегодня ещё остаются неизученными вопросы, касающиеся дальнейшей динамики морфофункциональных изменений ПЖ у потомства крыс, имевших алиментарную недостаточность в течение беременности, значимость этих изменений на становление репродуктивной функции у этих животных и здоровье их потомства, реальную угрозу формирования хронических заболеваний ПЖ (в том числе панкреатита и сахарного диабета) в зрелом возрасте животных. Выяснение этих вопросов на уровне эксперимента имеет важное значение для углубления знаний относительно патогенеза повреждения ПЖ при нарушении питания у взрослых людей и детей, а значит и совершенствования методов профилактики и лечения у них заболеваний ПЖ.

Литература

1. Балаш Л. В. Гістохімічні та електронномікроскопічні дослідження підшлункової залози та тлі експериментального цукрового діабету / Л. В. Балаш, А. М. Яценко, В. І. Ковалишин // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – Т. 8, №1. – 2009. – С. 37-43.
2. Болевич С. Б. Молекулярные механизмы в патологии человека: Руководство для врачей / С. Б. Болевич, В. А. Войнов. – М.: ООО «Изд-во «Медицинское информационное агентство». – 2012. – С. 8-10.
3. Губергриц Н. Б. Клиническая панкреатология / Н. Б. Губергриц, Т. Н. Христинич. – Донецк : ООО «Лебедь», 2000. – 416 с.
4. Пат. 81453 UA, G09B 23/28 (2006. 01), G09B 23/34 (2006. 01) Спосіб моделювання аліментарної білкової недостатності [текст] / Ніколаєва О. В., Ковальова М. В., Євтушенко Т. Г. (UA); заявник Харківський національний медичний університет (UA). – № у 2013 01910, заявл. 18. 02. 2013; опубл. 25. 06. 2013. Бюл. № 12. – 4 с.
5. Тотолян А. А. Клетки иммунной системы / А. А. Тотолян. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.
6. Herchuelz, A. Na(+)/Ca (2+) exchange and the plasma membrane Ca(2+)-ATPase in β -cell function and diabetes / A. Herchuelz, E. Nguidjoe, L. Jiang, N. Pachera // Adv. Exp. Med. Biol. – 2013. – P. 385-94.
7. O'Garra, A. Commitment factors for T helper cells / A. O'Garra // Curr. Biol. – 2000. – Vol. 10, № 13. – P. R492-R494.

УДК 616. 37–091. 8–092. 9:[612. 017. 1+577. 118]

ЦИТОКИНЫ, МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ ПРИ НАРУШЕНИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС И ИХ ПОТОМСТВА ВСЛЕДСТВИЕ ГИПОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ

Ковальцова М. В.

Резюме. В поджелудочной железе беременных крыс, получавших гипокалорийную диету, и у их потомства выявлены морфофункциональные изменения: уменьшение объема паренхимы и площади ацинусов, отёк, фиброз и липоматоз стромы, её воспалительная инфильтрация, дистрофические изменения ядер и цитоплазмы, активизация апоптоза ациноцитов; у крысят так же наблюдалась незрелость паренхимы, полнокровие капилляров; дисбаланс про- та протизапальных цитокинов с преобладанием маркерного цитокину Th1-лимфоцитов (IL-12); дисбаланс макро- и микроэлементов в ткани поджелудочной железы (гипер- или гипокальциемия, гипомагниемия, снижение содержания цинка). Подобные морфофункциональные изменения поджелудочной железы у животных, свидетельствуют о том, что гипокалорийная диета беременных крыс является существенным фактором риска развития хронической патологии поджелудочной железы (в том числе и сахарного диабета) в дальнейшем не только у самих крыс, но и у их потомства.

Ключевые слова: гипокалорийная диета, морфофункциональное состояние поджелудочной железы, беременные крысы и их потомство, цитокины, макро- и микроэлементы.

УДК 616. 37–091. 8–092. 9:[612. 017. 1+577. 118]

ЦИТОКИНИ, МАКРО- ТА МИКРОЕЛЕМЕНТИ ПРИ ПОРУШЕННІ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ У ВАГІТНИХ ЩУРІВ ТА ЇХ ПОТОМСТВА ВНАСЛІДОК ГІПОКАЛОРИЙНОЇ ДІЄТИ

Ковальцова М. В.

Резюме. У підшлунковій залозі вагітних щурів, які отримували гіпокалорійну дієту, та у їх нащадків виявлені морфофункціональні зміни: зменшення обсягу паренхіми та площі ацинусів, набряк, фіброз та ліпоматоз стромы, її запальна інфільтрація, дистрофічні зміни ядер та цитоплазми, активізація апоптозу ациноцитів; у щурят так само спостерігалася незрілість паренхіми, повнокров'я капілярів; дисбаланс про- та протизапальних цитокинів з переважанням маркерного цитокину Th1-лімфоцитів (IL-12); дисбаланс макро- та мікроелементів у тканині підшлункової залози (гіпер- або гіпокальціємія, гіпомагніємія, зниження вмісту цинку). Подібні морфофункціональні зміни підшлункової залози у тварин, свідчать про те, що гіпокалорійна дієта вагітних щурів є істотним чинником ризику розвитку хронічної патології підшлункової залози (у тому числі цукрового діабету) не тільки у самих щурів, а й у їх потомства.

Ключові слова: гіпокалорійна дієта, морфофункціональний стан підшлункової залози, вагітні щури та їх нащадки, цитокини, макро- та мікроелементи.

UDC 616. 37–091. 8–092. 9:[612. 017. 1+577. 118]

Cytokines, Major Mineral Elements and Trace Elements under Violation of Morphofunctional State of the Pancreas of Pregnant Rats and their Offspring Resulting from a Hypocaloric Diet

Kovaltsova M.

Abstract. Introduction. The pathology of the pancreas caused by the influence of exogenous pathogenic factors is an actual problem of modern medicine. Modern conditions of human life, and those of pregnant women in particular, result in a problem of fighting long mental and physical stress.

The purpose of the study was specification of pathogenetic actions in the violated pancreas followed by the affection of adverse exogenous factors in mother-fetus system via analysis of characteristics of major mineral elements and trace elements under violation of morphofunctional state of the pancreas of pregnant rats and their offspring resulting from a hypocaloric diet

Materials and Methods. We studied morphological changes of pancreas of pregnant rats and their offspring using histological, cytochemical, cytomorphometric and biochemical methods. A core group of adult rats received hypocaloric diet, while their offspring received normal balanced diet. Comparison group consisted of animals with a balanced diet, and their offspring of the same age. For the rats, the experiment was stopped immediately after the birth of offspring in compliance with the ethical principles.

Results. The pancreas of pregnant rats treated with hypocaloric diet revealed morphological changes: reduced parenchymal area and acini, edema, fibrosis and lipomatosis stroma, its inflammatory infiltration, degenerative changes in the nuclei and cytoplasm, activation of apoptosis of exocrine pancreatic cells. Stress during pregnancy in rats affects the morphology and function of the pancreas in the offspring. Symptoms of morphofunctional disorders are obvious even in the pancreas of newborn rats (and they are similar to those of their mothers). Most of them not only saves up until they are two months of age, but has a negative trend of growth severity: reducing the relative amount of parenchymal acini area, number and area of the islets of Langerhans, the number of endocrine cells in them. Young rats also presented immaturity of the parenchyma, moderate congestion of the capillaries. The rats in all groups are diagnosed as having identical tendencies of cytokines change; significant buildup of pro-inflammatory interleukin-12 and reduction of anti-inflammatory interleukin-4 which indicates predominant involvement in pathogenesis of violation of pancreas cell component of immune system. The study of macro-and microelements

level in the tissue homogenate showed an increase of calcium level by 20.9% in 100% of the rats-mothers. Magnesium level decreased in 50% of the rats (20% showed normal level, 30% – increased), while the average value of the index did not differ from that of animals of the comparison group. The level of zinc (in average by 44.7%) reduced in 100% of animals. All the rats of both groups, in contradistinction to their mothers, showed a significant decrease in calcium level, while the content of magnesium and zinc are the same as in those mothers, but lesser degree of severity. The findings allow to conclude that morphofunctional changes of a hypocaloric diet violation of the pancreas combine with macrocell imbalance (calcium and magnesium) and reduction of zinc level. These affect intracellular metabolism of pancreocytes, both exo- and endocrine secretory activity that can be a reason for aggravation of the pancreas, and promote inflammation and pancreatic deficiency.

Conclusions. The results suggest that chronic stress of pregnant rats is a significant risk factor for future chronic pathology of the pancreas (including diabetes mellitus) not only in rats themselves, but also in their offspring.

Key words: hypocaloric diet, morphology and function of the pancreas, pregnant rats and their offspring, cytokines, major mineral elements and trace elements.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 28. 04. 2014 р.