

ВПЛИВ СТРЕСУ ГІПОКІНЕЗІЇ НА ГОРМОНАЛЬНИЙ СТАТУС, ПОКАЗНИКИ МЕТАБОЛІЗМУ В КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ ТА МІКРОСТРУКТУРУ ДОВГИХ КІСТОК У НАЩАДКІВ ГЕСТАЦІЙНО СТРЕСОВАНИХ МАТЕРІВ

Сергієнко Л.Ю.

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

Сергієнко Л.Ю. Вплив стресу гіпокінезії на гормональний статус, показники метаболізму в кістковій тканині та мікроструктуру довгих кісток у нащадків гестаційно стресованих матерів // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 104-106.

Проведено визначення рівня гормонів у плазмі крові та гістологічне дослідження стегнових кісток 12-місячних самиць щурів – нащадків інтактних та стресованих на ранніх етапах гестації матерів в базовому стані та після гіпокінезії. Встановлено, що наявність стреса в матері під час вагітності виразно впливає на зміну гормонального тла та суттєво підвищує деструктивний вплив гіпокінезії на кісткову тканину статевозрілих нащадків ще в репродуктивному віці, що проявляється в формуванні чисельних вогнищ остеопорозу в діалізах стегнових кісток.

Ключові слова: стрес вагітних, нащадки, гіпокінезія, остеопороз.

Сергієнко Л.Ю. Влияние стресса гипокинезии на гормональный статус, показатели метаболизма в костной ткани и микроструктуру длинных костей у потомков гестационно стрессированных матерей // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 104-106.

Проведено определение уровня гормонов в плазме крови и гистологическое изучение бедренных костей у 12-месячных самок крыс – потомков интактных и стрессированных на ранних этапах гестации матерей в базовом состоянии и после теста гипокинезии. Установлено, что стресс матери во время беременности существенно влияет на изменение гормонального фона и усиливает деструктивное влияние гипокинезии на костную ткань у половозрелых потомков еще в репродуктивном возрасте, что проявляется в формировании многочисленных очагов остеопороза в диафизах бедренных костей.

Ключевые слова: стресс беременных, потомки, гипокинезия, остеопороз.

Sergienko L.Yu. The influence of stress hypokinesia on the hormonal status, markers of bone metabolism and the microstructure of the long bones in the offspring of gestational-stressed mothers // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С.104-106.

It was performed the determination of the level of hormones in the blood plasma and histological study of the femur in 12-month-old female rats – offspring of stressed and intact in the early stages of gestation mothers in the base state and after hypokinesia test. It was established that stress during pregnancy significantly influences on the hormonal levels changes and strengthens the destructive effect of hypokinesia on bone in mature offspring that which manifested in the formation of numerous foci of osteoporosis in the diaphysal parts of the hips.

Key words: stress of pregnant, offspring, hypokinesia, osteoporosis.

Насьогодні, шляхом як епідеміологічних обстежень, так і експериментальних досліджень, доведено, що дуже високий відсоток дітей, матері яких пережили довготривалі та сильний стрес у стані вагітності, має знижену вагу при народженні, а продовж життя в них розвиваються гіпертензія, ішемічна хвороба серця, діабет 2 типу з притаманним для нього інсуліновою резистентністю, гіперліпідемією, ожирінням [1, 2].

Вказана думка, що остеопороз, який перетворюється на справжню загрозу людуству [3, 4], також належить до так званих «антенатально запрограмованих хронічних хвороб дорослого віку» [5], причиною яких є модифікуючий вплив надлишку глюкокортикоїдів на реалізацію генетичної програми росту та розвитку функціональних систем плода при порушенні харчування або виникненні стресу в вагітній.

В своїх багаторічних дослідженнях, виконаних на нащадках самиць щурів, стресованих продовж першої третини вагітності, ми показали, що наслідком надлишкового надходження глюкокортикоїдів від матері в організм плода є виразні зміни в гістоструктурі та функції таких ендокринних залоз як надниркові залози, сім'яники, яєчники, щитовидна залоза, інсулінпродукуючі острівці підшлункової залози, що дозволило говорити про формування схильності до поліендокринопатій та зміни адаптаційних можливостей у таких нащадків матерів, стресованих на ранніх етапах вагітності [6].

Оскільки, як показано в наших дослідженнях, для нащадків гестаційно стресованих матерів притаманна зміна чутливості гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової та гіпоталамо-гіпофізарно-репродуктивної систем до дії стрес-чинників у дорослому житті, внаслідок чого підвищується рівень ендогенних глюкокортикоїдів та знижується рівень статевих гормонів у таких особин ще до настання періоду пре/менопаузи, нами було поставлене питання – чи віддзеркалюються ці

зміни на метаболізмі та мікроструктурі кісткової тканини як в умовах функціонального спокою, так і при стрес-навантаженнях у нащадків матерів, стресованих на ранніх етапах вагітності.

Пошук відповіді на вказані питання склав мету даного дослідження.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були плазма крові та стегнові кістки 12-місячних самиць щурів популяції Вістар – нащадків інтактних (НІМ) та стресованих (НСМ) матерів. Моделювання соціально-емоційного стресу в самиць у першому триместрі вагітності було проведено за відомою методикою [7]. Гіпокінезію (ГПК) в тварин відтворювали шляхом утримування у вузьких пластиківих пеналах протягом 1 години 7 діб поспіль. Щурів знеживлювали з дотриманням положень національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» [8], збирали зразки плазми крові та вилучали стегнові кістки, які фіксували в 10 % формаліні, а перед заливкою в парафін проводили декальцинацію за допомогою рідини Дженкінса. Серійні зрізи товщиною 3-5 мкм різних частин стегнових кісток фарбували гематоксинамом та еозиноом, оцінку гістоструктури проводили на мікроскопі «Primo Star» (Німеччина), обладнаному цифровою фотокамерою «Canon G10». Концентрацію тестостерону (Тс), естрадіолу (Е₂), тироксину (Т₄), трийодтироніну (Т₃) в плазмі крові виконано імуоферментним методом за допомогою відповідних комерційних наборів виробництва Інституту біоорганічної хімії АН Білорусі (м. Мінськ). Для встановлення рівня кортикостерону (КС) застосовували набір «Corticosteron ELISA» (Німеччина), кальцитоніну (К) – «Calcitonin ELISA» (США), лужної фосфатази (кісткова ізоформа) – набори «VAREIAKit» (Quidel Corporation, США). Для оцінки активності процесів моделювання-ремоделювання кісткової тканини було проведено комплекснометричне вимірювання вмісту загального

кальцію в плазмі піддослідних тварин та проведено розрахунок іонізованого кальцію за формулою І. Годорова [9]; для визначення вмісту загального білка та магнію використовували набори БІО ЛАТЕСТ (Чеська республіка), а для фосфору – набір «Реагент» (м. Дніпропетровськ, Україна). Концентрацію білків – учасників метаболізму колагену в кістковій тканині – проліну та оксипроліну було визначено методом [10].

Статистична обробка отриманих результатів

Таблиця. Гормональний статус та деякі показники метаболізму в кістковій тканині в самиць щурів – нащадків інтактних та гестаційно стресованих матерів, ($\bar{X} \pm Sx$, n=12)

Показник	Інтактні нащадки до ГпК	Інтактні нащадки після ГпК	Стресовані нащадки до ГпК	Стресовані нащадки після ГпК
Кортикостерон, нмоль/л	224,80±22,60	482,20±14,01**	417,08±15,10	433,04±12,53
Естрадіол, нмоль/л	0,39±0,06	0,35±0,03	0,11±0,03*	0,06±0,02**
Тестостерон, нмоль/л	1,26±0,12	2,04±0,09	2,94±0,32*	2,54±0,19
Кальцитонін нмоль/л	17,25±0,07	19,85±0,72	31,20±1,60*	19,82±0,73**
Гіроксин, нмоль/л	55,06±3,04	64,51±7,21	56,51±8,63	19,50±3,90**
Трийодотиронін, нмоль/л	2,08±0,40	0,75±0,16**	3,25±0,15*	1,42±0,45**
Кальцій загальний, ммоль/л	2,23±0,14	2,01±0,07	2,22±0,05	2,09±0,06
Кальцій іонізований, ммоль/л	1,03±0,04	1,08±0,03	0,96±0,08	0,89±0,08
Фосфор, ммоль/л	1,14±0,04	-	2,13±0,05*	-
Магній, ммоль/л	0,78±0,04	-	0,76±0,10	-
Колаген, мг/г сухої тканини	106,5±1,77	-	100,10±3,33	-
Оксипролін, мг/г сухої тканини	14,4±0,25	-	13,5±0,42	-
Тирозин, мг/г сухої тканини	1,35±0,03	-	1,29±0,06	-
Лужна фосфатаза (кісткова ізоформа), МО/л	3,48±0,18	3,02±0,70	2,68±0,06*	1,42±0,06**

Примітки: * - статистично значуща різниця ($P < 0,05$) між показниками інтактних та стресованих нащадків; ** - статистично значуща різниця ($P < 0,05$) між показниками групи до та після ГпК.

ГпК виразно підвищує рівень ендogenous КС та знижує рівень T_3 у НІМ ($P < 0,05$). У НСМ ГпК зменшує концентрацію E_2 , К, T_4 , T_3 та лужної фосфатази ($P < 0,05$), тобто за кількістю гормональних показників, котрі відхиляються від своєї базової величини при розвитку ГпК НСМ, демонструють більшу чутливість до екзогенного стресу, ніж НІМ.

Взагалі в літературі панує думка, що перебіг метаболічних процесів у кістковій тканині – доволі активний, і ця тканина високо чутлива до дії всіляких стресорів [12].

Дослідження особливостей гістоструктури довгих кісток (стегнової кістки) щурів самиць нащадків інтактних та гестаційно стресованих матерів у базовому стані та після ГпК підтвердили такий погляд.

Так, у НІМ 12-місячного віку трабекули губчастої речовини широкі, розгалужені, формують достатньо щільну сітку, в просторах якої знаходиться кістковий мозок. На поверхні трабекул спостерігаються остеокласти та ланцюжки остеобластів; трабекули утворені грубоволокнистою кістковою тканиною, остецити в якій розташовані неупорядковано серед однорідно зафарбованого остеоїду.

На відміну від описаного, в трабекулах кісток НСМ в цьому віці спостерігається велика кількість порожнин різного розміру, котрі зливаються між собою, і такі трабекули мають виразно знижену щільність кісткової маси. В середині порожнин можна бачити скупчення остеокластів, ферментативна активність яких і забезпечує перебудову цих кісткових утворень. Кількість остецитів у таких місцях різко зменшена. Іншими словами, в самиць НСМ у губчастих елементах метафізу стегна присутні ознаки незавершеного остеогенезу та прискореної резорбції остеоїду (рис. 1).

Коркова частина стегна в самиць НСМ даної вікової категорії характеризується невеликими неправильної форми остеодами, між якими знаходяться залишки старих Гаверсових систем (так звані «вста-

дійснена з використанням комп'ютерного пакету програму Excel [11].

Результати та їх обговорення. Як свідчать дані, представлені в таблиці, у 12-місячних самиць – НСМ у стані фізіологічного спокою спостерігаються виразні зміни як в гормональному статусі, так і в показниках метаболізму в кістковій тканині: рівні КС, T_3 та T_4 виразно перевищують показники в НІМ ($P < 0,05$); в той же час концентрація E_2 та лужної фосфатази знижена ($P < 0,05$).

вочні пластинки»). Подекуди кровоносні судини в центральних каналах остеонів гинуть, і такі канали мають вигляд порожнин з оголеною стінкою, що вказує на погіршення трофіки та розвиток остеодистрофічних процесів у корковій частині стегон НСМ.

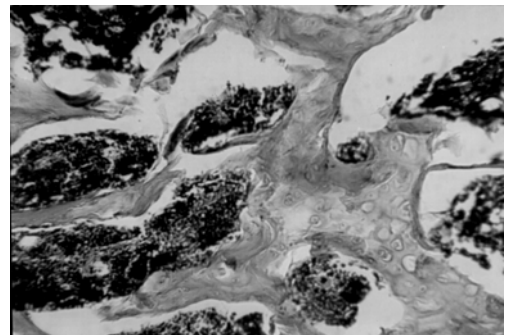


Рис. 1. Фрагмент поперечного розтину метафізарної частини стегна 12-місячної самиці щура – нащадка гестаційно стресованої матері. Гематоксилін-еозин. Зб. X 300.

Як показали вивчення гістологічних препаратів, проведення ГпК НІМ не призводить до зміни будови та щільності кісткової тканини в епіфізах стегнових кісток; незмінними лишаються також метафізарні ділянки. Разом з тим, наслідком ГпК НІМ в ді-афізах стегнових кісток є активізація проростання кровоносних судин з боку ендосту в шар внутрішніх генеральних пластинок. Кровоносні судини супроводжуються скупченнями остеокластів та ланцюжками остеобластів. В таких місцях відбуваються процеси активного ремоделювання шару ендостальних пластинок, за рахунок чого їх структура та щільність дещо змінюються.

Ще більші деструктивні зміни після ГпК мають місце в стегнових кістках самиць, котрі народилися від стресованих матерів. Внаслідок ГпК у цих тварин спостерігаються вогнища надзвичайно вираженого

руйнування губчастої кістки в метафізах та коркової частини діафізів стегнових кісток.

У трабекулах метафізів НСМ спостерігається атрофія та фрагментація. Більшість трабекул зовсім тонкі, мають щилини, тріщини, мікропереломи, виглядають як зламані або сколоті уламки (рис. 2), міжтрабекулярні простори розширені. На зовнішній поверхні трабекул та в середині порожнин, що їх пронизують, спостерігається скупчення остеокластів. У багатьох місцях діафізарної частини стегнових кісток у НСМ після ГпК деструкція охоплює всю товщу компактної кістки - від ендосту до періосту. Гаверсові системи при цьому зникають; кістка нагадує суцільне решето або губку („спонгізування“) (рис. 3). На внутрішній поверхні малих, середніх та великих порожнин у великій кількості знаходяться остеокласти. Остеобластів мало, що вказує на відставання процесів відновлення кістки від її резорбції.



Рис. 2. Фрагмент поперечного розтину метафізарної частини стегна 12-місячної самки щура – нащадка гестаційно стресованої матері після гіпокінезії. Гематоксилін-еозин. 36. X 300.



Рис. 3. Фрагмент поперечного розтину діафізарної частини стегна 12-місячної самки щура – нащадка гестаційно стресованої матері після гіпокінезії. Гематоксилін-еозин. 36. X 120.

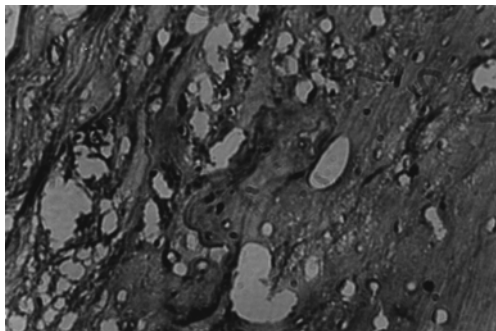


Рис. 4. Фрагмент поперечного розтину діафізарної частини стегна 12-місячної самки щура – нащадка гестаційно стресованої матері після гіпокінезії. Гематоксилін-еозин. 36. X 300.

Гістологічна картина свідчить про те, що трабекулярний тип остеопорозу, переважно притаман-

ний самцям – НСМ, під дією екзогенного стресора переходить у цих тварин у більш руйнівну – змішану форму, котра формується по каналікулярному типу (рис. 4). Оскільки зміни у мікробудові стегнових кісток НСМ після ГпК співпадають із виразними змінами гормонального рівня у цих тварин, нами зроблено висновок про надзвичайно високу чутливість процесів ремоделювання кісткової тканини до дії стресчинників у нащадків матерів, стресованих під час вагітності. Останнє дозволяє віднести таких нащадків до групи ризику щодо розвитку остеопатії ще в репродуктивному віці.

Результати нашої роботи не тільки підтверджують патогенетичну роль екзогенного стресу в розвитку остеопоротичних процесів, але й одночасно вказують на те, що ступінь виразності впливу стресу в післянатальному житті залежить від наявності чи відсутності стресування особини ще в ембріональному періоді.

Таким чином, наші дані дозволяють розглядати саме ембріональний стрес, як першопричину формування підвищеної чутливості кісткової тканини до дії стресорів (або їх комбінації) будь-якої природи продовж післянатального життя.

Висновки:

1. Деструктивні зміни після обмеження рухливості в трубчастих кістках нащадків стресованих матерів значно переважають аналогічні процеси в кістках нащадків інтактних самок, що свідчить про підвищену чутливість кісткової тканини ембріонально стресованих особин до дії екзогенних стресорів в післянатальному житті.

2. Нащадки матерів, стресованих під час вагітності, складають групи ризику розвитку остеопатологій ще в репродуктивному віці.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Nathanielsz P.W. Fetal programming: from gene to functional systems – an overview [Text] / P. W. Nathanielsz, K. L. Thornburg // J. Physiol. – 2003. – Vol. 547, N 1. – P. 3-4.
2. Fowden A. L. Endocrine mechanisms of intrauterine programming [Text] / A. L. Fowden, A. J. Forhead // Reproduction. – 2004. – Vol. 127. – P. 515-526.
3. Остеопороз – от редкого симптома эндокринных болезней до безмолвной эпидемии XX-XXI века [Текст] / И. И. Дедов, П. А. Мельниченко, Ж. Е. Белая, А. Я. Рожинская // Пробл. эндокринологии. – 2011. – № 1. – С. 35-47.
4. Cooper, G. Epidemiology of osteoporotic fracture: looking to the future [Text] / G. Cooper // Rheumatology. – 2005. – Vol. 4. – P. 36-40.
5. 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.
6. Вплив гестаційних негараздів матерів на систему адаптаційних гормонів нащадків (експериментальне дослідження) [Текст] / Л.Ю. Сергієнко, О.В. Карташова, Г.В. Герашенко [та ін.] // Пробл. ендокрин. патол. – 2004. - № 3. – С. 83 -89.
7. Pratt N. C. Effect of social stress during early pregnancy on litter size, sex ratio in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) [Text] / N. C. Pratt, R. D. Lisk // J. Reprod. Fert. – 1989. – Vol. 87. – P. 763-769.
8. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах [Текст] / за ред. О.Г. Резнікова // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142-145.
9. Биохимические методы исследования в клинике [Текст]: справочник / под ред. А. А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – 652 с.
10. Слуцкий А. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани [Текст] / А. И. Слуцкий. – Л.: Медицина, 1969. – 375 с.
11. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, А. Н. Бабич. – К.: Морнон, 2000. – 320 с.
12. Тимошенко О.П. Стресс как этиопатогенетический фактор структурно-метаболических повреждений костной и хрящевой тканей [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00. 02, 03.00.04 / Тимошенко Ольга Павловна; Моск. ордена Трудового Красного Знамени ветеринарная акад. им. К.И. Скрябина. – М., 1990. – 33 с.

Надійшло: 13.09.2012 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін