

УДК: 616.379-008.64:618.3]-06:616-008.9]-092.9

Ганчева О.В., Данукало М.В., Федотова М.И., Вародеева Ю.И.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ПЛОДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ВО ВЗРОСЛОМ ВОЗРАСТЕ

Запорожский государственный медицинский университет

Актуальность темы: В наше время ожирение стало эпидемией с высокими темпами распространения. Для исследования этиопатогенеза ожирения важно использовать адекватные экспериментальные модели для более детального анализа, прогнозирования, разработки методов ранней диагностики и предупреждения заболеваемости. Целью нашей работы было установить зависимость формирования метаболических нарушений у экспериментальных животных от сроков воздействия хронической гипергликемии во внутриутробном периоде; проанализировать особенности ее влияния на метаболизм в препубертатном возрасте. Материалы и методы: Исследование состояло из двух этапов. На первом были проанализированы результаты модельного эксперимента хронического воздействия гипергликемии на плод в разные периоды гестации – 2-3 и 14-15 сутки беременности самки. А затем изучены особенности метаболизма и гормонального статуса у 3-х месячных самцов, потомков самок с ЭГД. Результаты: Проведение первого этапа исследования позволило установить, что наиболее адекватной является модель ЭГД со сроком введения STZ на 14-15 сутки. Во втором этапе были установлены превышение общей массы, веса сердца, селезенки, а удельный вес тимуса ниже, чем в контроле. Выявлены нарушения показателей жирового обмена и уровня гормонов, у 3-х месячного потомства. При этом концентрация глюкозы во всех группах находилась в эугликемическом диапазоне, но уровень плазменного инсулина на 46% выше, чем в контроле. Выводы: Данная модель позволит уже в ранние возрастные периоды потомства выявить не только нарушения скрининговых показателей метаболизма, но и баланса регуляторных систем.

Ключевые слова: экспериментальный гестационный диабет, крысы, потомство, ожирение, метаболические нарушения.

Актуальность темы

Метаболические нарушения лежат в основе таких болезней цивилизации как сахарный диабет, ожирение, артериальная гипертензия, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и другие. Сегодня их распространенность в мире приобретает характер эпидемии, темпы которой остаются высокими на протяжении уже многих лет [1]. Угнетает не столько прогрессирующий характер распространения этих заболеваний, сколько резкое их омоложение. По прогнозам экспертов ВОЗ в Европейском регионе к 2025 году ожидается увеличение количества детей с ожирением до 5 млн. [2]. В Украине заболеваемость ожирением у детей возрастом от 0 до 14 лет составляет 2,6, а распространенность избыточного веса – 9,7 на 1000 населения соответствующего возраста [3]. Одновременно с увеличением числа заболевших детей ожирением, растет и тяжесть заболевания, что связано с недооценкой родителями сложности этой патологии, устойчивым стереотипом, о том, что упитанность ребенка является показателем его здоровья. Часто родители не воспринимают отклонение от нормы в весе своего ребенка, как патологическое состояние, особенно в регионах с высокой распространенностью детского ожирения [4].

Для проведения широкомасштабных исследований этиопатогенеза ожирения важно проводить не только тщательное наблюдение и исследование уже сформированной болезни, но и использовать адекватные экспериментальные модели для более детального анализа, прогнозирования, разработки методов ранней диагно-

стики и предупреждения заболеваемости.

В последнее время обсуждается идея «потенциально непрерывного цикла формирования метаболических нарушений между поколениями»: избыточный вес и нарушения метаболизма у женщины до беременности – риск гестационного диабета – риск рождения крупновесного плода – риск детского ожирения или избыточного веса с нарушениями в углеводном и жировом обменах – риск формирования ожирения, атеросклероза, гипертонии, сахарного диабета у взрослого [5]. Основываясь на современных представлениях этиопатогенеза ожирения, эксперты ВОЗ выделяют 6 критических периодов его возможного развития у человека, важнейшим из которых рассматривается пренатальный период развития плода. В этом периоде плод наиболее уязвим к действию различных рода воздействиям: состоянию гормонального статуса беременной, сбалансированности поступающих питательных веществ, изменению констант метаболизма. В частности, неблагоприятные факторы, воздействующие во время гестации плода такие, например, как внутриутробная хроническая гипергликемия, могут выступать предикторами формирования метаболических нарушений с последующим развитием целого комплекса патологий – ожирения, сахарного диабета, артериальной гипертензии, атеросклероза [6, 7]. Как правило, хроническая гипергликемия плода возникает в результате трех патологий материнского организма – это сахарного диабета 1 или 2 типа, при котором гипергликемия наблюдается уже с первых дней беременности,

раннего и позднего гестоза (гестационный диабет). В первом случае, когда будущая мать страдает сахарным диабетом 1 или 2 типа наблюдается гипергликемия с первого дня гестации, при раннем гестозе беременной наблюдается несколько схожая картина и явление гипергликемии отмечается в ранние сроки гестации на этапе морфо- и органогенеза. В третьем случае, при позднем гестозе, гипергликемия формируется в последнем триместре, когда органогенез уже завершен, плацента сформировалась, но происходит «тонкая настройка» сенсорных контактов, связей в нейрогуморальной системе, формируются рецепторные поля и межнейрональные взаимоотношения на уровне гипоталамуса и других регуляторных структур [8].

Цель работы

Установить зависимость формирования метаболических нарушений у экспериментальных животных от сроков воздействия хронической гипергликемии во внутриутробном периоде; проанализировать особенности ее влияния на метаболизм в препубертатном возрасте.

Материалы и методы

Исследование состояло из двух этапов. На первом были проанализированы результаты модельного эксперимента хронического воздействия гипергликемии на плод в разные сроки гестации – 2-3 и 14-15 сутки беременности самки (что соответствовало началу первого и третьего триместров беременности женщины). На втором – изучены особенности метаболизма и гормонального статуса у 3-х месячных самцов, потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД).

ЭГД моделировали однократным введением стрептозотоцина (STZ) в дозе 45 мг/кг веса самки. Первой группе крыс (10 самок) вводили STZ на 2-3 сутки, второй (n=10) – на 14-15 сутки беременности [9], группой контроля были интактные беременные самки в количестве (n=10). Полученное мужское потомство было распределено на три экспериментальные группы: 1-ю группу (n=10) составили крысы от самок с введением STZ на 2-3 сутки беременности возрастом 3 месяца, вторую (n=10) – потомство самок с 14-15 дневным введением STZ того же возраста, третью – потомство интактных самок (n=10). При достижении потомством 3-х месячного возраста их декапитировали под этиминаловым наркозом (50 мг/кг), отбирали кровь для биохимических исследований, определения уровня гормонов, проводили взвешивание органов (сердца, тимуса, селезенки). Для оценки состояния жирового обмена спектрофотометрически с использованием спектрофотометра и стандартных диагностических наборов (Lachema, Чехия) у экспери-

ментальных животных в плазме крови определяли общее содержание триглицеридов (ТГ) и холестерина (ХС). Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом с помощью стандартных тест-полосок Test Strip II на глюкометре Glucocard (ARKRAY Inc., Япония), концентрацию инсулина, лептина, кортикостерона и инсулиноподобного фактора роста (ИПФР-1) в плазме – иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы DRG (США).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрической *t* статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при $p_{st} < 0,05$.

Результаты

Проведение первого этапа исследования позволило установить, что моделирование ЭГД при сроках введения STZ на 2-3 сутки беременности самки имеет много недостатков. Это прежде всего плохая выживаемость и низкая масса новорожденного потомства, масса новорожденных была на 15-18 % достоверно ниже, чем у потомства интактных самок и 2-й группы, месячная выживаемость составила 72 %. Среди самок наблюдалось явление «каннибализма» собственного потомства. Дефицит веса при последующих контрольных взвешиваниях крысят составлял 10-12 %, по сравнению с контролем.

Вторая модель со сроком введения STZ на 14-15 день беременности, по нашему мнению, является наиболее адекватной. Аргументами в ее пользу стало то, что среди потомства выживаемость была достаточно высокой и составила 92-95 %, «каннибализма» среди самок не наблюдалось, вес крысят при рождении превышал показатели контрольной группы на 35 % ($p_{st} < 0,05$), в процессе контрольных ежемесячных взвешиваний вес животных прогрессивно возрастал, превышая показатели контроля на 35-75%.

В ходе проведения второго этапа исследования нами было установлено, что к 3-х месячному возрасту, который можно рассматривать как эквивалент препубертатного периода человека, у потомства самок 1-й группы наблюдался 15 % ($p_{st} < 0,05$) дефицит веса, тогда как среди потомства 2-й группы было отмечено превышение общей массы на 57 % ($p_{st} < 0,05$), по сравнению с группой контроля. Масса сердца и селезенки у потомства обеих групп была достоверно выше, чем в контроле, что необходимо рассматривать как макросомию органов, тогда как тимуса – у потомства 1-й группы была достоверно на 29 % ($p_{st} < 0,05$) ниже, а 2-й группы несмотря на тот факт, что абсолютная масса была на 26 % ($p_{st} < 0,05$) выше, чем в группе сравнения, процент удельного веса был ниже, чем в контроле – 0,17 против 0,21 (табл. 1).

Таблиця 1

Общий вес и масса органов у 3-х месячного потомства ($M \pm m$)

Экспериментальные группы	Вес животных, г	Масса сердца, г (уд.вес %)	Масса селезенки, г (уд.вес %)	Масса тимуса, г (уд.вес %)
Контрольные самцы, 3 мес.	177,7±8,21	0,55±0,02 (0,30)	0,72±0,02 (0,40)	0,38±0,01 (0,21)
Самцы, потомки самок 1-й группы (2-3 сутки STZ)	152,5±5,8 ¹	0,72±0,02 ¹ (0,47)	0,86±0,02 ¹ (0,56)	0,27±0,01 ¹ (0,18)
Самцы, потомки самок 2-й группы (14-15 сутки STZ)	279,5±6,6 ^{1,2}	0,99±0,03 ^{1,2} (0,35)	1,23±0,03 ^{1,2} (0,44)	0,48±0,02 ^{1,2} (0,17)

Примечания: 1. (¹) – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) по отношению к контрольной группе.

2. (²) – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) потомков самок 2-й группы по отношению к показателям 1-й группы.

Анализируя состояние углеводного обмена, нами был установлен интересный факт. Концентрация глюкозы во всех группах находилась в зугликемическом диапазоне, а у потомства самой 2-й группы несмотря на это уровень плаз-

менного инсулина на 46 % ($p_{St} < 0,05$) был достоверно выше, чем в контроле (табл. 2). Также были выявлены нарушения концентраций показателей жирового обмена и уровня гормонов, требующие детального анализа и обсуждения.

Таблиця 2

Показатели жирового обмена и концентрации гормонов у 3-х месячного потомства ($M \pm m$)

Экспериментальные группы	Конц. триглицеридов, мМ/л	Конц. холестерина, мМ/л	Конц. инсулина-мкЕД/мл	Конц. лептина, нг/мл	Конц. кортикостерона, нг/мл	Конц. ИПФР-1, нг/мл
Контрольные самцы, 3 мес.	1,62±0,05	5,01±0,14	6,35±0,22	2,62±0,08	22,52±2,8	88,4±8,3
Самцы, потомки самок 1-й группы (2-3 сутки STZ)	1,72±0,05	6,14±0,12 ¹	5,28±0,18 ¹	3,74±0,1 ¹	24,3±2,9	72,6±7,1
Самцы, потомки самок 2-й группы (14-15 сутки STZ)	2,4±0,07 ^{1,2}	7,42±0,46 ^{1,2}	9,31±0,39 ^{1,2}	5,66±0,16 ^{1,2}	36,27±3,55 ^{1,2}	125,2±10,1 ^{1,2}

Примечания: 1. (¹) – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) по отношению к контрольной группе.

2. (²) – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) потомков самок 2-й группы по отношению к показателям 1-й группы.

Таким образом, проведенные исследования и анализ полученных результатов позволяют нам утверждать, что экспериментальная модель гестационного диабета со сроком индукции на 14-15 день беременности крысы является наиболее адекватной для моделирования. Она обладает определенными преимуществами по сравнению с другими моделями, а именно – неслезная воспроизводимость, низкая летальность среди самок и их потомства, формирование у крысят стойких метаболических нарушений, тождественность некоторых симптомов проявлениям последствий гестационного диабета матери для ребенка (макросомия органов, прогрессивное возрастное увеличение массы тела, гиперинсулинемия, нарушения в белковом, жировом и углеводном обменах, изменения в гормональном статусе [10]).

Установленный факт гиперинсулинемии на фоне тощаковой зугликемии у самцов, потомков самок 2-й группы можно рассматривать как формирование скрытой инсулинорезистентности. Выявленная нами макросомия органов у крыс этой группы, вероятнее всего, свидетельствует влиянии хронической гипергликемии на процессы морфогенеза с нарушением последнего. Увеличение уровня гормонов, ключевых регуляторов белкового (кортикостерона, ИПФР-1 и инсулина) и жирового (лептина и инсулина) можно рассматривать как важное патогенетическое звено в механизме развития последующих метаболических нарушений с формированием стойких изменений уже в виде конкретной нозо-

логии (ожирения, сахарного диабета, атеросклероза и др.).

Выводы

Для экспериментального изучения роли пренатальной гипергликемии в формировании метаболических нарушений у потомства крыс необходимо использовать поздние сроки индукции – 14-15 день беременности. Использование предложенной модели позволит уже в ранние возрастные периоды потомства выявить не только нарушения скрининговых показателей метаболизма, но и баланса регуляторных систем (эндокринной, нервной, иммунной).

Перспективы дальнейших исследований

Установленные у крыс, потомков самок с ЭГД, изменения гормонального статуса, сдвиги скрининговых констант жирового обмена свидетельствуют о формировании существенных изменений метаболизма с возможным развитием целого комплекса патологий – это, прежде всего инсулинорезистентности, эндотелиальной дисфункции, ремоделирования миокарда, артериальной гипертензии, сахарного диабета, ожирения. Изучению этих вопросов и будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Литература

1. Ожирение и избыточный вес. ВОЗ – Информативный бюллетень, май 2014. – № 311.
2. WGO Global Guideline Obesity. – World Gastroenterology Organization, 2009. – С. 42.
3. Леженко Г.А. Факторы формирования артериальной гипертензии у детей с ожирением / Г.А. Леженко, К.В. Гладун, Е.Е. Пашкова // Дитячий лікар. – 2011. – № 3. – С. 23-34.

- Binkin N. What is common becomes normal: The effect of obesity prevalence on maternal perception / N. Binkin, A. Spinelli, G. Baglio [et al.] // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* – 2013. – V. 23, № 5. – P. 410-416
- Bouchard C. Childhood obesity: are genetic differences involved? / C. Bouchard // *Am.J.Clin.Nutr.* – 2009. – Vol. 89(suppl.). – P. 1494-1501.
- Metzger B.E. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome (HAPO) study associations with neonatal anthropometrics / B.E. Metzger, L.P. Lowe, A.R. Dyer [et al.] // *Diabetes.* – 2009. – V. 58, № 2. – P. 453-459.
- Zhao Z. New concepts in diabetic embryopathy / Z. Zhao, E.A. Reece // *Clin Lab Med.* – 2013. – V. 33, № 2. – P. 207-233
- Пат. 17281 Україна, МПК G09 №23/28. Спосіб моделювання гестаційного діабету у щурів лінії Вістар для вивчення його наслідків для нащадків / Колесник Ю.М., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., Ганчева О.В., Камишний О.М., Грекова Т.А. - № у 2006 03504 ; заявл. 31.03.06 ; опубл. 15.09.06, Бюл. № 9.
- Catalano P.M. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes / P.M. Catalano, H.D. McIntyre, J.K. Cruickshank [et al.] // *Diabetes Care.* – 2012. – V. 35, № 4. – P. 780-786.
- Luo Z.C. Maternal and fetal IGF-I and IGF-II levels, fetal growth, and gestational diabetes / Z.C. Luo, A.M. Nuyt, E. Delvin [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – V. 97, № 5. – P. 1720-1728.

Реферат

ЕКПСЕРИМЕНТАЛЬНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ ПЛОДУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ МЕТАБОЛІЗМУ У ДОРΟΣЛОМУ ВІЦІ

Ганчева О.В., Данукало М.В., Федотова М.І., Вародєєва Ю.І.

Ключові слова: експериментальний гестаційний діабет, щури, потомство, ожиріння, метаболічні порушення.

На сучасному етапі захворюваність на ожиріння набула характеру епідемії з досить високими темпами розповсюдження. Для дослідження етіопатогенезу ожиріння важливо використовувати адекватні експериментальні моделі для більш детального аналізу, прогнозування, розробки методів ранньої діагностики та попередження захворюваності. Метою нашої роботи було встановити залежність формування метаболічних порушень у експериментальних тварин від термінів впливу хронічної гіперглікемії у внутрішньоутробному періоді; проаналізувати особливості її впливу на метаболізм у препубертатному віці. Матеріали і методи: Дослідження складалося з двох етапів. В першому були проаналізовані результати модельованого експерименту хронічного впливу гіперглікемії на плід в різні періоди гестації – 2-3 і 14-15 доба вагітності самки. А потім вивчені особливості метаболізму і гормонального статусу у 3-х місячних самців, нащадків самок з експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД). Результати: Проведення першого етапу дослідження дозволило встановити, що найбільш адекватною є модель ЕДГ зі строком введення STZ на 14-15 добу. На другому етапі було встановлено підвищення загальної маси і ваги серця, селезінки, а питома вага тимусу нижче, ніж у контролі. Виявлено порушення показників жирового обміну і рівня гормонів у 3-х місячного потомства. При цьому концентрація глюкози в усіх групах знаходилася в еуглікемічному діапазоні, але рівень плазмового інсуліну на 46% вище, ніж в контролі. Висновки: Дана модель дозволить вже в ранні вікові періоди потомства виявити не тільки порушення скринінгових показників метаболізму, а й балансу регуляторних систем (ендокринної, нервової, імунної).

Summary

EXPERIMENTAL MODELING OF FETAL CHRONIC HYPERGLYCEMIA FOR STUDYING SPECIFIC CHARACTER OF METABOLISM IN ADULTHOOD

Gancheva O.V., Danukalo M.V., Fedotov M.I., Varodeeva Yu.I.

Keywords: experimental gestational diabetes, rats, offspring, obesity, metabolic disorders.

Nowadays obesity has become an epidemic of high occurrence rate. To investigate the etiopathogenesis of obesity, it is important to use adequate experimental patterns for more detailed analysis, forecasting, and developing the methods for early diagnosis and prevention of the disease. The aim of our study was to establish the dependence of the formation of metabolic disorders in experimental animals on the duration of chronic hyperglycemia impacts in uterus; to analyze the features of its influence on metabolism in the prepubertal age. Materials and Methods. The study consisted of two phases. During the first phase we analyzed the results of modelled experiment designed to study chronic effects produced by hyperglycemia on the fetus at different periods of gestation, and namely, on the 2–3 and 14 –15 days of gestation. Then we studied the characteristics of metabolism and hormonal status in 3-month male offsprings of females with EGD. Results. Implementation of the first phase of the study has revealed that the most appropriate model is the EGD with the term of STZ administration on the 14 –15 day. During the second phase we registered exceeding of the total body weight, the weight of the heart, spleen, while specific weight of thymus was lower than that in the control group. 3-month offspring showed disorders of lipid metabolism indices and hormone levels. At the same time the glucose concentration in all groups was within the euglycemic range, but the level of plasma insulin was by 46% higher than in control group. Conclusions. This model allows detecting not only abnormalities of the screening parameters of metabolism in the early age of offspring, but also the disturbances in the balance of regulatory systems.