

УДК УДК 612.351.11:[618.3-06:616.36-008.811.6]-092.9

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ПОТОМСТВА КРЫС ОТ САМОК С ХОЛЕСТАЗОМ

Н. И. Марковец (duduk.natalya@mail.ru), М. А. Хлеббин (arahnidas@mail.ru),  
С. М. Зиматкин (smzimatkina@mail.ru)

УО "Гродненский государственный медицинский университет", Гродно, Беларусь

**Введение.** Последствия холестаза беременных на развитие печени у потомства практически не изучены.

**Цель исследования** – выяснить влияние экспериментального холестаза матери на морфофункциональное состояние печени двух и 15-суточного потомства и возможность коррекции нарушений урсодезоксихолевой кислотой.

**Материалы и методы.** В работе использован материал от 30 беспородных белых крысят, гистологический, гистохимический, морфометрический и статистический методы исследования.

**Результаты.** Установлено, что у самок опытной группы происходит удлинение сроков беременности, крысята рождаются слабыми и менее жизнеспособными. На вторые сутки постнатального развития в опытной группе «Холестаз» наблюдается увеличение содержания гликогена, активность сукцинатдегидрогеназы снижается, а дегидрогеназы никотинамиддинуклеотида (НАДН-ДГ) – повышается. Под влиянием холестаза матери в печени 15-суточного потомства расширяются синусоидные капилляры, уменьшаются размеры гепатоцитов, в их цитоплазме происходит снижение активности дегидрогеназы никотинамиддинуклеотида, повышение активности лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы.

**Заключение.** Урсодезоксихолевая кислота частично восстанавливает структуру и метаболизм гепатоцитов во все сроки исследования.

**Ключевые слова:** холестаз, беременность, потомство, печень, урсодезоксихолевая кислота

---

## MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN THE LIVER OF THE OFFSPRING OF RATS WITH INDUCED CHOLESTASIS

N. I. Markovets, M. A. Khlebin, S. M. Zimatkin

Educational Institution "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

**Background.** The influence of cholestasis of pregnant women on the development of the liver in their offspring is not well studied.

**Objective.** The aim of the study was to determine the effect of the experimental cholestasis of the mother on the morphofunctional state of the liver of 2 and 15-day progeny and the possibility of correcting the disorders with ursodeoxycholic acid.

**Materials and methods.** In the research the material from 30 outbred white rats, histological, histochemical, morphometric and statistical methods of investigation were used.

**Results.** It was established that the females of the experimental group undergo prolongation of pregnancy; the rats are born weak and less healthy. On the 2nd day of postnatal development in the experimental group "Cholestasis" an increase in the glycogen content is observed, the activity of succinate dehydrogenase is reduced, and NADH dehydrogenase is increased. Under the influence of mother's cholestasis, sinusoidal capillaries dilate in the liver of the 15-day progeny, the sizes of hepatocytes are reduced, the activity of NADH dehydrogenase decreases, the activity of lactate dehydrogenase and acid phosphatase increases in the cytoplasm.

**Conclusion.** Ursodeoxycholic acid partially restores the structure and metabolism of hepatocytes throughout the study period.

**Keywords:** cholestasis, pregnancy, offspring, liver, ursodeoxycholic acid

---

### Введение

Холестаз – застой, нарушение выделения желчи – занимает значительное место в клинической картине заболеваний гепатобилиарной системы. Его своевременная диагностика и лечение имеет большое практическое значение. Нарушения метаболизма желчных кислот возникают при холестазах любой этиологии и проявляются в снижении экскреции желчных кислот с желчью, задержке их в печени, следствием чего является сдвиг пула желчных кислот в сторону депонирования их в плазме и периферических тканях [3, 6, 12]. Ведущий фактор повреждения клеток печени при холестазах – накопление в них компонентов желчи, а именно солей желчных кислот и билирубина [11].

В организме женщины во время беременности происходят сложные анатомо-топографические, нейроэндокринные и метаболические сдвиги, приводящие к изменению деятельности всех органов и систем организма. Предполагают, что избыток эндогенных половых гормонов, свойственный периоду беременности, оказывает стимулирующее влияние на процессы желчеобразования и угнетающее – на желчевыделение [13].

Урсодезоксихолевая кислота (УДХК) – естественная нетоксичная гидрофильная желчная кислота, являющаяся составной частью пула желчных кислот. Основные механизмы действия УДХК – цитопротективный и холеретический эффекты, обусловленные изменением пула желчных кислот с вытеснением УДХК токсических первичных желчных кислот (хенодеоксихолевая и др.), всасывание которых в кишечнике тормозится. Кроме того, УДХК обладает иммуномодулирующим действием, вызывая снижение экспрессии антигенов HLA I и II классов на гепатоцитах, клетках билиарного эпителия, уменьшение продукции провоспалительных цитокинов. УДХК характеризуется также антиапоптозным и антиоксидантным эффектом [14].

Последствия холестаза беременных для развития внутренних органов, в частности печени, у потомства изучены недостаточно.

**Цель исследования** – оценка морфофункциональных нарушений в печени двух- и 15-суточных крысят, рожденных в условиях экспериментального холестаза матери, выяснение возможности их коррекции препаратом УДХК.

### Материалы и методы

В работе использован материал от 30 беспородных белых крысят двух- и 15-суточного возраста. 20 крысят – потомство животных с экспериментальным подпеченочным холестазом, вызванным на 17-е сутки беременности путем наложения лигатуры на верхнюю часть общего желчного протока [4]. Десять особей из их числа взяты от самок, которые с 17-х суток беременности

и до 7-х суток после родов получали урсодезоксихолевую кислоту в дозе 50 мг/кг/сут с небольшим количеством обезжиренного творога. Полное потребление препарата крысами строго контролировали (на данный способ введения имеется рацредложение № 1620 от 30.08.2012 г). Десять контрольных крысят родились от самок, которым в этот же срок беременности проделывали все те же хирургические манипуляции, но без перевязки общего желчного протока (ложнооперированные животные). Первым днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках. С этого дня и до родов опытных и контрольных самок, а также родившихся от них крысят содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На данное исследование получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета.

Опытных и контрольных крысят подвергали эвтаназии парами эфира с последующей декапитацией, быстро извлекали и взвешивали печень. Один кусочек печени каждого животного фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм монтировали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы толщиной 10 мкм использовали для определения в клетках печени нейтральных гликопротеинов по методу Шабадаша. Другие кусочки печени после взятия помещали на полоски маркированной фильтровальной бумаги и замораживали в парах жидкого азота с последующим погружением в него. До начала исследования образцы хранили в жидком азоте. Срезы толщиной 10 мкм готовили в криостате (Leica CM 1850) при  $t$  20°C, наклеивали на предметные стекла, подсушивали в течение 1 часа и использовали для определения в гепатоцитах активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ; КФ 1.3.99.1); лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ 1.1.1.27); дегидрогеназы никотинамиддинуклеотида (дегидрогеназы никотинамиддинуклеотида; КФ 1.6.99.3); кислой фосфатазы (КФ; фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2). Окрашенные срезы промывали в дистиллированной воде, фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилолах и заключали в полистирол. Для изучения гистологических и гистохимических препаратов, их микрофотографирования и морфометрии использовали микроскоп Axioscop 2 plus (Karl Zeiss, Germany) с цифровой видеокамерой (Leica DFC 320, Germany) и программу компьютерного анализатора изображения Image Warp (Bit Flow, USA).

Для количественной оценки размеров и формы гепатоцитов их контуры обводили курсором на мониторе компьютера. Для оценки активности изучаемых ферментов определяли оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме гепатоцитов на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций.

Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью лицензионной программы Statistica 9.0 для Windows (StatSoft, Inc., USA). В описательной статистике для каждого показателя определяли значение медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Достоверными считали различия между контрольной и опытными группами при значениях  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test).

### Результаты и обсуждение

У контрольных крысят на 2-е сутки после рождения печень покрыта тонкой соединительнотканной капсулой. Вокруг триад в соединительнотканых прослойках в больших количествах встречаются очаги кроветворения, состоящие из клеток эритроцитарного и гранулоцитарного ростков гемопоэза. Границы долек плохо очерчены из-за слабого развития соединительной ткани. Нередко встречаются двухъядерные гепатоциты, что является нормой для печени крысенка данного возрастного периода. Печеночные балки, так же как и синусоидные капилляры, имеют извитой ход, без четкого радиального расположения (рисунок 1).

У крысят контрольной группы на 15-е сутки постнатального развития печень покрыта тонкой соединительнотканной капсулой, границы долек плохо очерчены, в ядрах гепатоцитов преобладает эухроматин. Прослеживается достаточно четкое балочно-радиарное строение печеночных долек. Нередко встречаются двухъядерные гепатоциты. Наблюдается незначительное расширение и кровенаполнение как портальных сосудов, так и синусоидных капилляров.

У самок-крыс с холестазом происходит удлинение сроков беременности в среднем на 1-2 дня по сравнению с контрольными. Количество крысят у них не отличается от контроля, однако крысят рождаются слабыми и менее жизнеспособными. При заборе материала у них отмечается желтизна внутренних органов, в частности печени и серозных оболочек.

На вторые сутки после рождения масса крысят, родившихся от матерей с холестазом, на 17% меньше, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), а масса печени не отличается от аналогичного показателя в контроле. У них в печени наблюдается меньшее количество очагов кроветворения, располагаются они в дольке неравномерно, в них повышено количество мегакариоцитов. Выявляется некоторое расширение и кровенаполне-

ние как портальных сосудов, так и синусоидных капилляров. Цитоплазма гепатоцитов окрашивается оксифильно темнее, чем в контрольной группе, и умеренно вакуолизирована (рисунок 1). В группе «Холестаз+УДХК» масса крысят на 19,3% больше, чем в группе «Холестаз» ( $p < 0,05$ ) и достоверно не отличается от контроля. Масса печени в данной группе на 23% больше, чем в группах «Контроль» и «Холестаз» ( $p < 0,05$ ). Синусоидные капилляры умеренно расширены. Сохраняется меньшее количество очагов кроветворения и повышенное количество мегакариоцитов. Как и в группе «Холестаз», наблюдается темная оксифильная окраска цитоплазмы гепатоцитов с незначительной микровакуолизацией (рисунок 1).

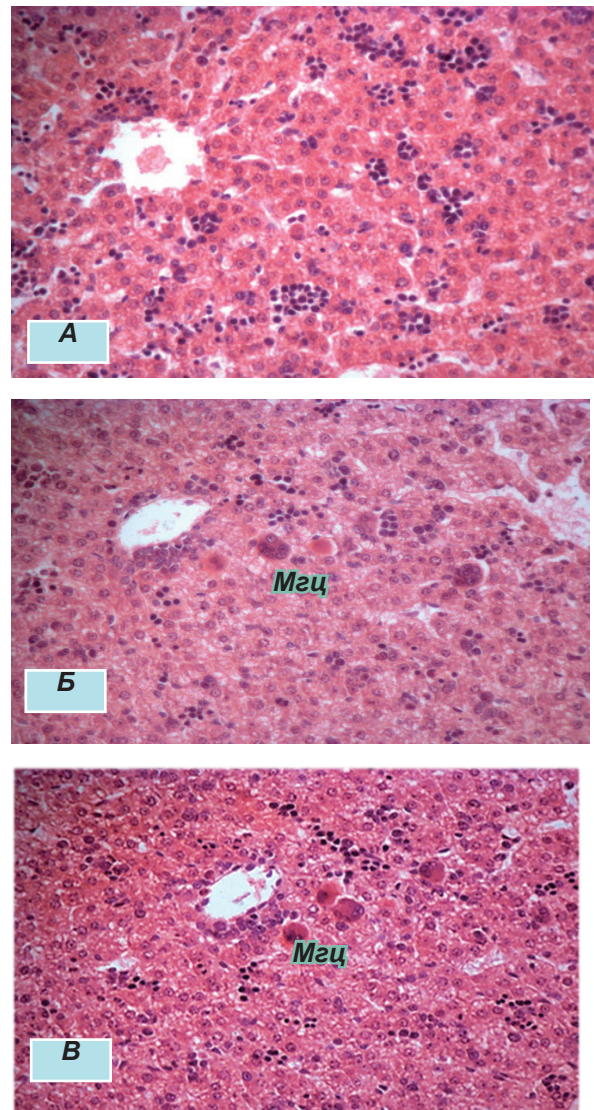


Рисунок 1. – Большое количество очагов кроветворения в печени двухсуточных контрольных крысят (А), их уменьшение в группе «Холестаз» (Б) и «Холестаз+УДХК» (В). Большое количество мегакариоцитов (Мец) в опытных группах. Расширение междольковых сосудов в группе «Холестаз» (Б) (показано стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. Цифровая микрофотография. Ув. 200



На 15-е сутки постнатального развития в группе «Холестаз+УДХК» масса крысят меньше, чем в контрольной группе, на 15% ( $p<0,05$ ). В то же время масса печени в данной группе несколько увеличивается по сравнению с группами «Контроль» и «Холестаз» (на 8,4 и 9,5%, соответственно). Синусоидные капилляры остаются расширенными. В центральной части классической печеночной дольки животных, рожденных в условиях холестаза, происходит уменьшение максимального диаметра гепатоцитов (на 5%) ( $p<0,05$ ), а площади – на 8% ( $p<0,05$ ). В периферической части отмечается уменьшение максимального диаметра гепатоцитов (на 4%) ( $p<0,05$ ), площади – на 5,4% ( $p<0,05$ ). Показатели формы клеток не отличаются от контрольных значений. Под действием УДХК происходит увеличение размеров гепатоцитов по таким параметрам, как площадь, максимальный и минимальный диаметры на периферии и в центральной части печеночной дольки. При этом данные показатели становятся даже выше, чем в контроле.

Изменения размеров гепатоцитов у крысят, возможно, происходят из-за нарушения водно-электролитного и кислотно-щелочного равновесия в организме. Известно, что холестаз у взрослых животных приводит к существенному снижению содержания  $K^+$  в плазме крови из-за увеличения его экскреции с мочой, а экскреция  $Na^+$  с мочой уменьшается. При этом в крови накапливаются пировиноградная и молочная кислоты, что приводит к развитию ацидоза [5]. Учитывая, что компоненты желчи проходят через плацентарный барьер [8] и поступают с молоком матери, можно полагать, что аналогичные изменения развиваются и у потомства.

Уменьшение размеров клеток, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения свидетельствует о замедлении процессов дифференцировки гепатоцитов в постнатальном онтогенезе. Полученные данные говорят о том, что содержащиеся в организме беременных самок с экспериментальным холестазом повышенные концентрации билирубина, желчных кислот, печеночных ферментов и других компонентов вызывают нарушение тканевого гомеостаза в организме потомства, что приводит к развитию в его органах, в частности печени, определенных нарушений [1, 2, 7].

При проведении гистохимического исследования было установлено, что в опытной группе «Холестаз» на 2-е сутки после рождения содержание гликогена в печени выше, а на 15-е сутки меньше, чем в контроле (на 21,3% ( $p<0,05$ )) (рисунок 2). В группе «Холестаз+УДХК» содержание гликогена в печени во все сроки исследования не отличается от контроля.

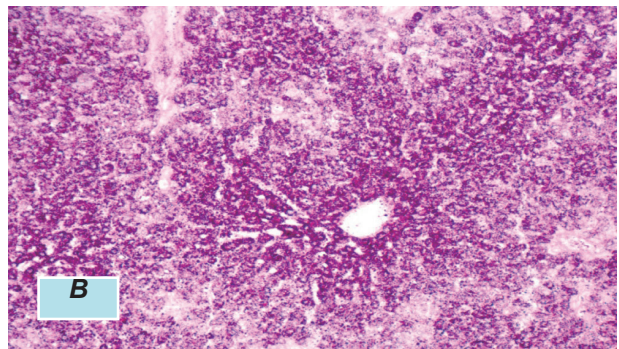
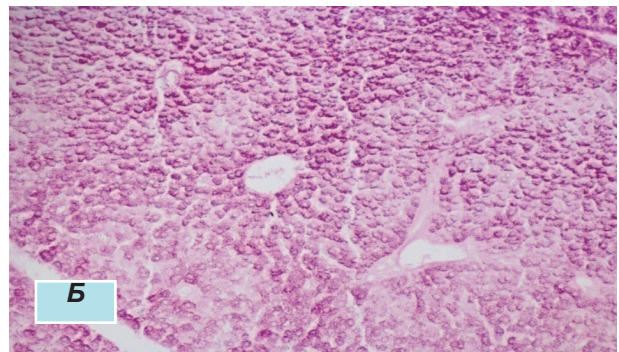
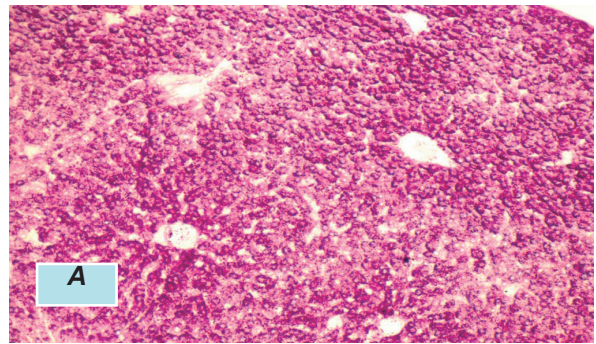


Рисунок 2. – Гликоген в гепатоцитах 15-суточного контрольного крысенка (А), его уменьшение в группе «Холестаз» (Б) и повышение в группе «Холестаз+УДХК» (В). Окраска по методу Шабадша. Цифровая микрофотография. Ув. 100

По данным литературы, впервые гликоген в печени плода появляется в конце периода внутриутробного развития. У плодов млекопитающих, которые через плаценту получают глюкозу из крови матери, печень не обладает активной гликогенсинтезирующей функцией. Гликоген у плода крыс обнаруживается с 18-го дня внутриутробного развития и к 20-м суткам достигает максимума [10]. Пониженное содержание гликогена в цитоплазме гепатоцитов у потомства крыс с холестазом может быть связано с нарушением углеводного обмена в печени (угнетением синтеза либо ускорением распада этих сложных углеводов).

В гепатоцитах двухсуточных крысят от самок с холестазом активность маркерного фермента митохондрий СДГ на 42,6% ниже ( $p<0,05$ ), чем в

контрольной группе, а у 15-суточных крысят не отличается от контроля. При применении УДХК активность данного фермента во все сроки исследования не отличается от контроля.

Активность другого маркерного фермента митохондрий, связанного с транспортом электронов, НАДН-дегидрогеназы, у двухсуточных крысят выше на 40% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. На 15-е сутки постнатального развития активность НАДН-ДГ в группе «Холестаз», напротив, снижается на 40% ( $p < 0,05$ ). Под влиянием УДХК активность фермента во все сроки исследования не отличается от контроля.

Другой фермент, отвечающий за энергетический баланс клетки и являющийся маркером анаэробного гликолиза – ЛДГ, на 15-е сутки после рождения у потомства крыс от самок с холестазом выше контроля на 32% ( $p < 0,05$ ). При применении УДХК активность ЛДГ во все сроки исследования не отличается от контроля.

Снижение активности сукцинатдегидрогеназы на периферии печеночных долек у потомства крыс с холестазом говорит о нарушении энергетического метаболизма гепатоцитов, однако повышенная активность ЛДГ на 15-е сутки постнатального развития свидетельствует об усилении анаэробного окисления для компенсаторного поддержания жизнедеятельности клетки. Повышение активности ЛДГ и снижение активности СДГ свидетельствует о том, что энергопотребность клеток обеспечивается в большей степени

анаэробным, чем аэробным путем окисления, что наблюдается на 2-е и 15-е сутки постнатального развития, возможно, для компенсаторного поддержания жизнедеятельности клетки.

Активность маркерного фермента лизосом КФ на 2-е сутки после рождения в гепатоцитах потомства крыс от самок с холестазом не отличается от контроля. На 15-е сутки постнатального онтогенеза активность КФ выше, чем в контроле, на 24% ( $p < 0,01$ ), что можно рассматривать как проявление усиленной аутофагии, направленной на удаление поврежденных мембран и органелл гепатоцитов [9]. В группе «Холестаз+УДХК» активность КФ в этот срок сохраняется на уровне группы «Холестаз».

### Выводы

Таким образом, нарушения структуры и функции материнской печени разной степени во время беременности вызывают однотипные изменения в печени потомства. Повышенные требования, предъявляемые в этом случае к печени плода, приводят к запоздалому ее развитию, функционированию и нарушению структурной дифференцировки ее паренхимы [10].

УДХК способна частично корригировать данные нарушения: происходит нормализация размеров клеток, содержания гликогена, активности ключевых ферментов энергетического баланса клетки СДГ и ЛДГ.

### References

1. Duduk, N. I. Morfofunkcional'nye izmenenija pečeni i vozmožnost' ih korrekcii u potomstva krys s holestazom [Morphofunctional changes in the liver and the possibility of their correction in the offspring of rats with cholestasis] / N. I. Duduk, R. I. Kravchuk, S. M. Zimatkin // Morfologija. – 2015. – Т. 147, № 1. – С. 48-53. (Russian)
2. Duduk, N. I. Korrekcija morfofunkcional'nyh izmenenij pečeni potomstva krys s jeksperimental'nym holestazom [Correction of morphofunctional liver changes in the progeny of rats with experimental cholestasis] / N. I. Duduk, R. I. Kravchuk, S. M. Zimatkin // Vesci NAN Belarusi. Seryja med. navuk. – 2014. – № 3. – С. 80-85. (Russian)
3. Grin'ko, I. V. Mehanizmy razvitija jendotoksemii i biliarnogo cirroza pri jeksperimental'nom holestaze: puti korrekcii [Mechanisms of development of endotoxemia and biliary cirrhosis in experimental cholestasis: correction pathways] / I. V. Grin'ko, A. A. Krivchik // Vesci NAN Belarusi. – 2002. – № 4. – С. 100-109. (Russian)
4. Kizyukevich, L. S. Reaktivnye izmenenija v pochkah pri jeksperimental'nom holestaze [Reactive changes in the kidneys in experimental cholestasis]: monografija / L. S. Kizyukevich. – Grodno: GrGMU, 2005. – 239 s. (Russian)
5. Ključareva, A. V. Vnutripechenochnyj holestaz beremennyh [Intrahepatic cholestasis of pregnant women] / A. V. Ključareva, L. V. Vavilova // Zdravoošranenie. – 2007. – № 3. – С. 72-73. (Russian)
6. Kolichestvennaja ocenka gibeli gepatocitov i dinamika nekotoryh biohimicheskikh parametrov krovi i zhelchi pri jeksperimental'noj mehanicheskoj zheltuhe [Quantitative evaluation of hepatocyte death and dynamics of some biochemical parameters of blood and bile under experimental

- mechanical jaundice] / V. G. Davydov [i dr.] // RZHGGK. – 2007. – Т. 18, № 1. – С. 25-31. (Russian)
7. Kuz'min, V. N. Sostojanie problemy zheltuhi i holestaza v sovremennom akusherstve [Status of jaundice and cholestasis in modern obstetrics] / V. N. Kuz'min // Ginekologija. – 2009. – Т. 11, № 6. – С. 8-12. (Russian)
8. Kushnareva, N. S. Reguljacija jekskretnornoj funkcii pečeni krysy pri holestaze: rol' prolaktina [Regulation of the excretory function of the rat liver in cholestasis: the role of prolactin]: avtoreferat dissertacii na soiskanie uchenoj stepeni kandidata biologicheskikh nauk: 03.00.13 / N. S. Kushnareva; MGU im. M. V. Lomonosova. – M., 2009. – 25 s. (Russian)
9. Pokrovskij, A. A. Lizosomy [Lysosomes] / A. A. Pokrovskij, V. A. Tutil'yan. – M.: Nauka, 1976. – 351 s. (Russian)
10. Savchenkov, Yu. I. Očerki fiziologii i morfologii funkcional'noj sistemy «mat'-plod» [Essays on the Physiology and Morphology of the Functional System "Mother-Fetus"] / Yu. I. Savchenkov, K. S. Lobynceva. – M.: Medicina, 1980. – 210 s. (Russian)
11. Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat / J. Lee [et al.] // Digestive and Liver disease. – 2001. – Vol. 121. – P. 1473-1484.
12. Alleu, K. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanisms of inflammation during obstructive cholestasis / K. Alleu, H. Jaeschke, B. Copples // Am. J. Pathol. – 2011. – Vol. 178, № 1. – P. 175-186.
13. Koopen, N. Molecular mechanisms of cholestasis: causes of consequences of impaired bile formation / N. Koopen // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – 1999. – Vol. 1408. – P. 1-17.
14. Kowdley, K. V. Ursodeoxycholic acid therapy in hepatobiliary disease / K. V. Kowdley // Am. J. Med. – 2000. – Vol. 108, № 6. – P. 481-486.

Поступила: 12.04.2017

Принята к печати: 19.04.2017