

УДК 616.36 – 008.811.5:591.465:612.357.15] – 092.9

**ПРОТЕКЦИЯ УРСОФАЛЬКОМ
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ
ЖЕНСКОЙ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ 15-СУТОЧНОГО
ПОТОМСТВА КРЫС, ПОДВЕРГШЕГОСЯ В
ЭМБРИОНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ УСЛОВИЯМ ХОЛЕСТАЗА
(экспериментальные исследования)**

Я.Р. Маджук, С.Я. Гудиневич

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

4 ЖК г. Гродно

В эксперименте на 34 крысятах-самочках 15-суточного возраста, применив в комплексе гистологические и гистохимические методы с последующим морфометрическим и цитофотометрическим анализом установлено, что ежедневное пероральное введение беременным животным с момента создания у них в завершающий период обособления у эмбрионов зачатков органов (12-е сутки беременности) обтурационного холестаза и неделю спустя после родов урсофалька (50 мг/кг) оказывает протективный эффект – растворяет у рожившегося потомства задержку состоянием холестаза становления структур в развивающихся яичниках, яйцеводах и матке, уменьшает в них деструктивные изменения, сопровождаясь при этом усилением в последних сниженной активности СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ, КФ и увеличением содержания гликопротеинов.

Ключевые слова: беременность, холестаз, яичники, яйцеводы, матка, урсофальк.

In the experiment on 34 female 15-day-old rats born from mothers with induced cholestasis we applied the complex histological and histochemical methods and the subsequent morphometric and cytophotometric analyses to evaluate the effect of ursofalk (50 mg/kg daily), since the creation of experimental cholestasis during the final period of organ isolation (12th day of pregnancy) and 1st week after the labour on the later reproductive organ development. The results had shown the protective effect of ursofalk: softened retardation of structure formation in developing ovaries, ovary ducts and uterus, reduction of the destructive changes in these organs and enhancement in the latter of the lowered activity of succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, acid phosphatase, and in the glycoprotein content.

Key words: pregnancy, cholestasis, posterity, ovaries, ooducts, uterus, ursofalk.

Аналитический обзор

Холестаз беременных чаще всего проявляется в 3-м триместре беременности. При этом наблюдается зуд, повышение в сыворотке крови билирубина, щелочной фосфатазы и особенно пула желчных кислот [4, 9, 12]. Последнее приводит к повреждению канаккулярных и базолатеральных мембран клеток. Это подтверждается увеличением во взрослом организме, при нарушении в нем энтерогепатической циркуляции желчи продуктов ПОЛ [14], и развитием в его органах выраженных структурных и метаболических изменений [1, 9, 10]. Лечение холестатических заболеваний печени урсофальком (урсодезоксихолевая кислота) является эффективным, поскольку резко снижает в организме пул токсических гидрофобных желчных кислот, уменьшает способность к мицеллообразованию. Концентрация при этом урсодезоксихолевой (практически безвредной) кислоты возрастает, а ее способность образовывать с холестерином жидкие кристаллы делает возможным растворение холестериновых камней, стабилизирует структуру клеточных мембран [5, 11]. Как влияет холестаз беременных на развивающиеся органы потомства, существует ли зависимость нарушения развития от

срока беременности, в период которого развился холестаз – не изучено. Лишь установлено, что при этом имеют место преждевременные роды, зачастую летальный исход новорожденных [3, 13]. В эксперименте установлено, что холестаз беременных, вызванный в период обособления зачатков органов у эмбрионов, вызывает задержку становления морфофункциональных свойств органов женской половой системы, не только в ранний постнатальный период, но даже в зрелом возрасте [2, 6]. Возможно ли предотвратить эти нарушения, неизвестно, несмотря на медицинскую и социальную значимость затронутого вопроса. В связи с вышеизложенным, была поставлена цель установить в эксперименте проявления протективных свойств урсофалька в развитии структурно-метаболических нарушений в органах женской половой системы потомства, рожившегося в условиях холестаза, развившегося в эмбриональном периоде в сроки обособления их зачатков.

Материалы и методы

Эксперимент проводился на 24 беременных самках, изначальной массой 180-200 г и 34 рожившихся от них крысятах-самочках. Последние подразделялись на 3 группы. 1 группу составляли

крысята-самочки, родившиеся от животных, которым на 12 сутки беременности экспериментально вызывали внепеченочный обтурационный холестаз. Во 2-ю группу входили крысята-самочки, родившиеся от самок, которым с момента создания у них обтурационного холестаза (12 сутки беременности) и неделю спустя после родов ежедневно с пищей вводили урсофальк в дозе 50 мг/кг. 3-ю группу составляли крысята-самочки, родившиеся от животных, которым в аналогичный срок беременности производилась лишь лапаротомия. Крысята этой группы служили контролем. Самки и родившиеся от них крысята опытных и контрольной групп находились в одинаковых условиях вивария и под тщательным наблюдением.

На 15 сутки после рождения крысят опытных и контрольных групп взвешивали и подвергали эвтаназии парами эфира. Извлекали яичники (взвешивали), яйцеводы, матку и иссекали для исследования кусочки. Одни из них после фиксации в жидкости Карнуа заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм и окрашенные гематоксилином и эозином использовались для гистологических и морфологических исследований, а 10 мкм – для определения в изучаемых органах содержания гликопротеинов. Другие кусочки после глубокого замораживания в жидком азоте монтировали на объектодержателях по принципу «контроль-опыт». Криостатные срезы толщиной 10 мкм использовали для определения локализации и активности в структурах органов дегидрогеназ сукцината (СДГ), лактата (ЛДГ), восстановленного НАД (НАДН-ДГ) и кислой фосфатазы (КФ) [7]. Для морфометрических исследований использовали систему компьютерного анализа изображений «Bioskan», а количественную оценку активности ферментов в гистохимических препаратах проводили на приборе МФТХ-2 и «Bioskan». Полученный цифровой материал статистически обрабатывался на персональном компьютере с применением пакета программ «Statistica 6.0» для Windows.

Результаты и их обсуждение

Данные проведенных гистологических и морфометрических исследований представлены в таблице.

Анализ последних показал, что ежедневные пероральные введения животным с момента создания на 12-е сутки беременности внепеченочного холестаза и неделю спустя после родов урсофалька (50 мг/кг) оказывают у 15-суточного потомства положительные воздействия на измененные состоянием холестаза становление структур в развивающихся яичниках, яйцевод и матке. Это весьма наглядно даже при беглом сравнительном просмотре гистологических препаратов органов опытных и контрольных крысят. У крысят, находившихся под воздействием урсофалька, имело место не только восстановление сниженного состоянием холестаза общего числа фолликулов в корковом веществе яичников, но и изменение их качественного состава – нормализовалось на поле

Таблица. Количественные параметры яичников, яйцеводов и матки 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза и находившихся под воздействием урсофалька

Показатели	Холестаз (1 группа)	Холестаз + урсофальк (2 группа)	Контроль (3 группа)
Яичник			
Общее число фолликулов в поле зрения (20x10)	21,5±2,09	25,31±1,60	23,79±3,5
Из них:			
примордиальных	12,13±0,55	11,07±1,37	11,21±2,88
растущих	5,25±0,98	10,50±0,59**	6,37±0,54***
диаметр ооцита (мкм)	28,0±2,72	35,56±0,64	31,29±1,34
вторичных	4,13±0,59*	3,43±0,31	6,21±0,24***
диаметр ооцита (мкм)	42,77±1,72	44,26±0,45	43,13±1,58
диаметр ядра фолликулярных клеток (мкм)	5,73±0,63	6,48±0,62	6,28±0,40
третичных	0	0	0
атретичных	3,04±0,24*	0,86±0,23	1,02±0,19
Яйцевод			
Число складок слизистой	2,81±0,43*	6,86±0,63**	5,5±0,57
Длина складок (мкм)	27,36±1,73*	60,67±7,18**	54,93±1,49
Высота эпителиоцита (мкм)	14,76±0,84*	17,15±0,42**	17,62±0,41
Толщина мышечной оболочки (мкм)	18,30±1,17*	22,33±1,50	16,55±1,42
Матка			
Число желез	3,25±0,61	5,86±0,51**	6,50±0,44
Длина железы (мкм)	40,33±1,17*	66,45±5,29*	67,44±1,39
Высота эпителиоцита слизистой (мкм)	12,32±0,71*	15,63±0,24*	18,50±0,37
Толщина миометрия (мкм)	51,33±1,09*	47,10±1,6	74,85±0,92

Примечание: * - показатели достоверны при сравнении 1 и 3 групп, ** - при сравнении 1 и 2, а *** - 2 и 3 групп (P<0,05).

зрения микроскопа число примордиальных фолликулов и достоверно увеличилось количество растущих. Среди последних, в отличие от крысят, родившихся в условиях холестаза, перестали выявляться фолликулы, содержащие несколько ооцитов. Увеличились размеры ооцитов. В цитоплазме ооцитов растущих фолликулов возрастало содержание оксифильной зернистости и явлений ее вакуолизации практически не наблюдалось. Хроматин в их ядрах приобретал мелкогранулярную, вместо конденсированной, консистенцию. Более отчетливо выделялась вокруг ооцита и блестящая оболочка. Возрастало количество фолликулярных клеток, что приводило к увеличению размеров фолликулов. Притом фолликулярные клетки, прилежащие к ооциту, отличаются более высокими базофильными свойствами хроматина ядер. По мере отдаления от ооцита базофилия ядер снижалась. Среди фолликулярных клеток чаще стали встречаться митотически делящиеся формы. Более отчетливо определялась вокруг растущих фолликулов соединительнотканная оболочка. В ней, во внутреннем слое, стали чаще выделяться просветы кровеносных капилляров.

Вторичные фолликулы «холестатических» крысят, получавших урсофальк, также отличались более крупными размерами, хотя их количество оставалось сниженным. Увеличение размеров фолликулов обусловлено увеличением диаметра их ооцитов, числа и размера фолликулярных клеток. Между фолликулярными клетками стали чаще появляться расширенные межклеточные пространства и полости разных размеров, что свидетельствует об активации их секреторной деятельности. Структурно измененные формы ооцитов и окружающих их фолликулярных клеток встречались

реже, чем у крысят, родившихся в условиях холестаза. Тека вокруг фолликулов хорошо развита с отчетливо выделяющимся внутренним сосудистым слоем. Значительно уменьшилось в корковом веществе и число атретических фолликулов.

В яйцеводах 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза и находившихся под воздействием урсофалька, не только восстанавливались, но увеличивались до уровня выше нормы число складок слизистой, их длина, высота выстилающих их эпителиоцитов. Более мощно развитой становилась и мышечная оболочка (см. табл.).

Аналогичные изменения наблюдались и в матке, однако выявленные в ней структурные изменения имели менее отчетливый, нежели в яйцеводе, характер: восстанавливались к норме на поле зрения число маточных желез в слизистой, их глубина и высота выстилающих слизистую оболочку эпителиоцитов. Толщина же миометрия оставалась сниженной, как у крысят родившихся, в условиях холестаза (см. табл.).

Изменялись и цитохимические свойства развивающихся структур. Однако последние не однозначны у разных типов клеток, органах и показателях. Так, значительно сниженная у крысят, родившихся в условиях холестаза активность СДГ в фолликулярных клетках примордиальных, растущих и вторичных фолликулов, в апикальных отделах эпителиоцитов яйцеводов и матки при воздействии урсофалька заметно не менялась в структурах яичника, тогда как в эпителиоцитах яйцеводов, матки возрастала существенно, что приводило к появлению в них выраженной полярности (рис. 1).

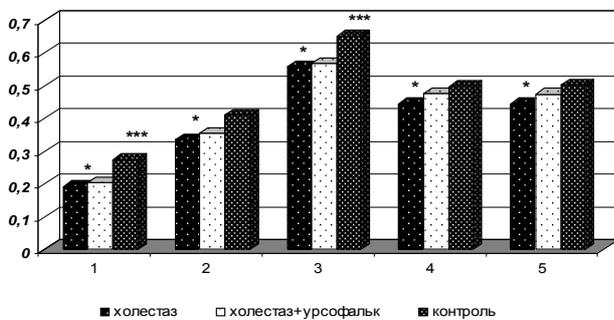


Рис. 1. Активность СДГ в фолликулярных клетках яичников, эпителиоцитах яйцеводов и матки 15-суточных крысят по данным морфометрии. $M \pm m$.

1 - фолликулярные клетки примордиальных, 2 - растущих, 3 - вторичных фолликулов, 4 - эпителиоциты яйцеводов и 5 - матки

Примечание: * - показатели достоверны при сравнении первой и третьей групп, ** - первой и второй, а *** - второй и третьей групп ($P < 0,05$).

Активность ЛДГ, сниженная аналогично в вышеречисленных структурах у опытных «холестатических» крысят, пероральное введение в организм матери с момента создания у них экспериментального холестаза урсофалька вызвало наоборот, увеличение активности этого фермента, особенно в фолликулярных клетках вторичных, меньше растущих и примордиальных фолликулах. Не-

значительное восстановление ферментной активности имело место в эпителиоцитах яйцеводов и матки (рис. 2).

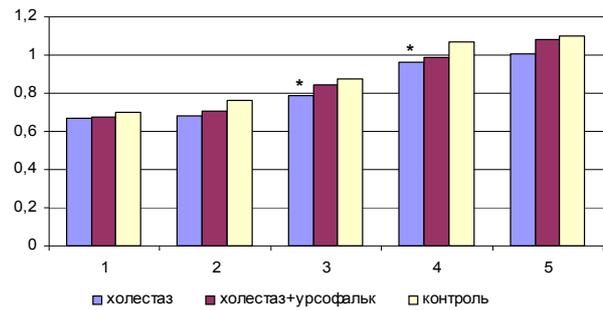


Рис. 2. Активность ЛДГ в фолликулярных клетках, эпителиоцитах яйцеводов и матки опытных и контрольных 15-суточных крысят по данным цитофотометрии $M \pm m$

1 - фолликулярные клетки примордиальных, 2 - растущих, 3 - вторичных фолликулов, 4 - эпителиоциты яйцеводов и 5 - матки

Примечание: * - показатели достоверны при сравнении первой и третьей групп, ** - первой и второй, а *** - второй и третьей групп ($P < 0,05$).

Сниженная активность НАДН-ДГ в фолликулярных клетках, особенно растущих и вторичных фолликулов, эпителиоцитах яйцеводов и матки у 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза при воздействии урсофалька восстанавливалась в значительной степени, как в фолликулярных клетках фолликулов яичников, так и эпителиоцитах яйцеводов и матки (рис. 3).

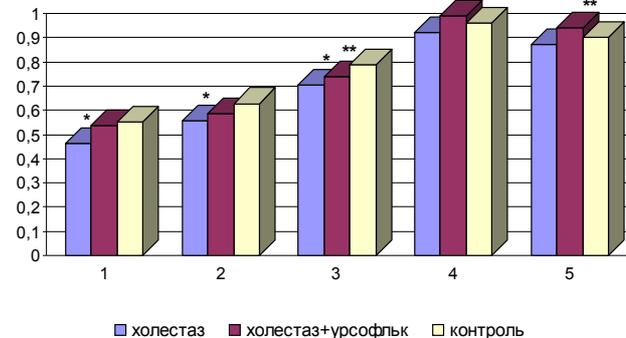


Рис. 3. Активность НАДН-ДГ в структурных компонентах яичников, яйцеводов и матки 15-суточных крысят по данным цитофотометрии. $M \pm m$

1 - фолликулярные клетки примордиальных, 2 - растущих, 3 - вторичных фолликулов, 4 - эпителиоциты яйцеводов и 5 - матки

Примечание: * - показатели достоверны при сравнении первой и третьей групп, ** - первой и второй, а *** - второй и третьей групп ($P < 0,05$).

Восстанавливалась, особенно в фолликулярных клетках растущих фолликулов, менее вторичных, эпителиоцитах яйцеводов, матки и активность КФ. (рис. 4).

Возрастало под воздействием урсофалька и содержание гликопротеинов, незначительно сниженное состоянием холестаза матери. Наиболее отчетливо это наблюдалось в цитоплазме ооцитов. Здесь имело место и отложение гранул гликогена. Возрастало содержание гликопротеинов и в блестящей оболочке ооцитов.

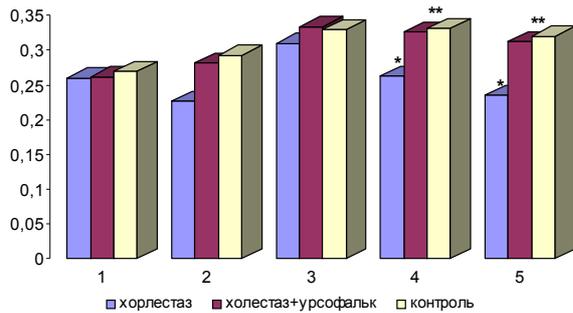


Рис.4. Активность КФ в развивающихся фолликулах яичника, эпителии яйцеводов и матке 15-суточного потомства

1 - фолликулярные клетки примордиальных, 2 - растущих, 3 - вторичных фолликулов, 4 - эпителиоциты яйцеводов и 5 - матки

Примечание: * – показатели достоверны при сравнении первой и третьей групп, ** – первой и второй, а *** – второй и третьей групп ($P < 0,05$).

Усилилась ШИК-положительная реакция в апикальных отделах эпителиоцитов яйцеводов, матки, возрастала фоновая окраска цитоплазмы миоцитов миометрия.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ежедневное пероральное введение беременным крысам с момента создания у них обтурационного холестаза и неделю спустя после родов урсофалька (50 мг/кг), оказывает протективный эффект на структурные и цитохимические изменения в развивающихся органах женской половой системы 15-суточного потомства, родившегося в условиях холестаза.

Литература

1. Ганиткевич Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма // Киев: Наукова думка. – 1980, – 178с.
2. Гудинович С.Я., Мацюк Я.Р. Неблагоприятные для матери и потомства последствия обтурационного холестаза (экспериментальное исследование) // Актуальные вопросы перинатологии. Мат. науч.-практ. конф. посв. 60-л. ГОРД. – Гродно. – 2005, – С. 93-97.
3. Закревский А.А. Беременность и роды при хронических заболеваниях печени и желчных путей // Антенатальная охрана плода и профилактика перинатальной патологии: Тез. докл. – Киев. – 1979, С.98-99.
4. Козырев М.А. Заболевание печени и желчных путей // Минск: Бел. наука. – 2002, – 248с.
5. Ларионова Л.Г. Основные проблемы холестаза и пути его терапевтической коррекции // Мед. новости. – 1998, – № 8. – С.12-16.

6. Мацюк Я.Р., Гудинович С.Я. Морфофункциональные свойства яичников, яйцеводов, матки 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза // Журнал ГрГМУ. – 2005, – № 4. – С. 46-49.
7. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная). – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 962с.
8. Чиркин А.А. Терапия препаратами урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) // Акт. вопр. гепатологии. Тез. докл. в междунар. симп. гепатол. Беларуси. – Минск. – 2004, – С. 130-131.
9. Шехтман М.И. Экстрагенитальная патология и беременность. – Л.: Медицина, 1987. – 236 С.
10. Шехтман М.И., Коротько Г.Ф., Бурков С.Г. Физиология и патология органов пищеварения у беременных // Ташкент: Медицина. – 1989. – 160с.
11. Mitsuoyoshi H., Nakashima T., Sumida Y. et al. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative, injury via induction of antioxidants // J. Biochem. and Biophys. Res/ Commun. – 1999, – 263, – №2 – С. 537-542.
12. Nokila K., Riikonen S., Billing B. Effect of prolonged bile duct obstruction in the rat on hepatic transport of bilirubin // Clin. Sci. – 1985. – V. 68. – № 3. – P. 809-811.
13. Plaza F.S., Diaz R.S., Pardo O., Perez C. Colestasis intraghepatica del embarazo. Una intermedad benigna // Rev. Esp. Enferm. Digest. – 1996, - V.88.-№11. – P.809-811.
14. Sing Li., Yanbang Chi., Xuesun F. Zhongguo puwai sicu ju linchuang zazhi // Clin. S. Bases and Clin. Seery. – 1998.- V.5, – №3, – P.148-149.

Resume

THE PROTECTIVE EFFECT OF URSOFALK ON THE MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES IN FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF 15-DAY-OLD RATS EXPOSED TO CHOLESTASIS FROM THE EMBRYONAL PERIOD (EXPERIMENTAL INVESTIGATION).

Ya.R. Matsiuk, S.Ya. Gudinovich

Grodno State Medical University

Experimental histological and histochemical methods have shown that in the 15-day-old rats born from mothers with induced extrahepatic obтураtional cholestasis (during the final period of organ isolation (12th day of pregnancy) the daily oral ursofalk administration (50 mg/kg) from the time of cholestasis induction to the labour and 1 week after that) had a protective effect on the changes caused by cholestasis – the retardation of structure formation in developing ovaries, ovary ducts and uterus, reduced the destructive changes in these organs and increased the lowered activity of succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, acid phosphatase and the glycoprotein content.

Поступила 06.09.06