

УДК: 612.35:[618.3-06:616.35-008.81]-092.9

## ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПЕЧЕНИ ПОТОМСТВА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ХОЛЕСТАЗОМ

*Дудук Н.И., Зиматкин С.М.*

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*Последствия холестаза беременных на развитие печени у потомства практически не изучены. Используя соматометрический, гистологический, гистохимический и статистический методы исследования на 80 крыс-тах 2-90-суточного возраста, было установлено, что подпеченочный холестаз, экспериментально вызванный у крыс-самок на 17-е сутки беременности, задерживает у их потомства развитие печени, вызывает нарушение ее гистологического строения, размеров и метаболизма гепатоцитов.*

**Ключевые слова:** беременность, холестаз, потомство, печень.

Обструктивный холестаз, возникающий при различных заболеваниях печени, особенно у женщин, препятствуя экскреции билирубина через желчевыводящие пути, ведет к его аккумуляции в составе желчи в печени, увеличению его уровня в крови и индуцирует альтернативный путь его удаления через почки [14]. Клинические проявления холестаза беременных обусловлены избыточным поступлением элементов желчи в кровь, уменьшением количества или отсутствием желчи в кишечнике, воздействием компонентов желчи на печеночные клетки и каналцы. При длительном холестазе возможно присоединение бактериальной инфекции желчевыводящих путей, которая может привести к гематогенному пути инфицирования децидуальной оболочки, плаценты, амниона, амниотической жидкости и внутриутробно-му инфицированию плода [11].

Холестаз беременных, сопровождающийся нарушением функций естественных систем детоксикации, гиперкоагуляцией, нарушением микроциркуляции, неблагоприятно сказывается на состоянии плода, что проявляется в виде хронической гипоксии, плацентарной недостаточности и гипотрофии. Это связано с тем, что компоненты желчи проходят через плацентарный барьер [10, 11, 13], что в свою очередь приводит к нарушениям течения раннего неонатального периода [6, 12].

Последствия холестаза у беременных крыс для органогенеза у родившегося потомства интенсивно изучаются на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета [3, 7, 8]. Вместе с тем нарушения развития у потомства печени изучены недостаточно. В наших предварительных исследованиях эти изменения описаны у потомства крыс через 15 [2-Б] и 45 [1-А] суток после рождения. В настоящей работе впервые проведено исследование динамики морфофункциональных изменений в печени потомства крыс с экспериментальным холестазом в постнатальном онтогенезе (2-90 сутки после рождения).

**Цель исследования** – сравнительная гистологическая и гистохимическая характеристика печени потомства крыс с холестазом на 2-, 15-, 45- и 90-е сутки постнатального развития.

**Материалы и методы.** В работе использован материал от 80 беспородных белых крысят 2-, 15-, 45- и 90-суточного возраста, по 20 крысят в каждой возрастной группе. По 10 крысят в каждой группе – потомство животных с экспериментальным подпеченочным холестазом, вызванным на 17-е сутки беременности путем наложения лигатуры на верхнюю часть общего желчного протока [4]. По 10 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 Шабадша [9]. 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  $t -20^{\circ}\text{C}$ , 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); NADH-дегидрогеназы (NADH-ДГ; КФ 1.6.99.3); глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ; КФ 1.1.1.49); кислой фосфатазы (КФ; фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2) [9]. 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

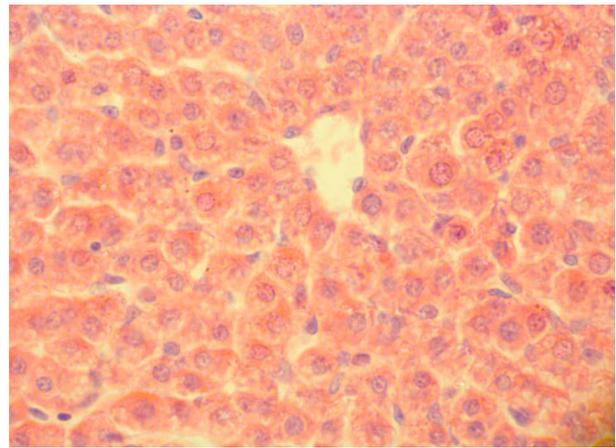
на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций.

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).

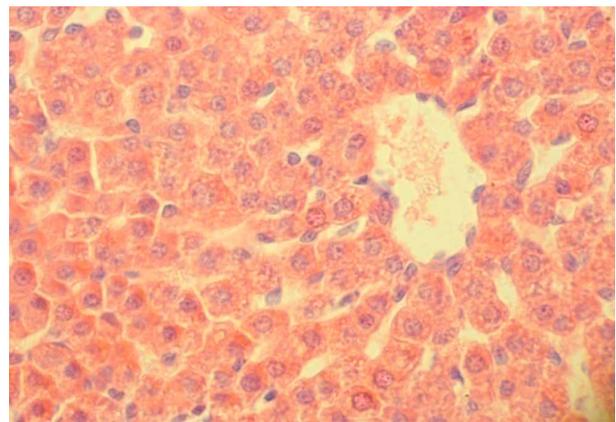
**Результаты и их обсуждение.** При выведении самок из эксперимента на 25-30-е сутки после родов наличие холестаза у опытных самок подтверждалось макроскопически, гистологически и биохимически (желтизна внутренних органов и серозных оболочек, увеличение размеров печени и ее зеленоватый цвет, закругленный край; дистрофия гепатоцитов, периваскулярная лимфогистиоцитарная инфильтрация, гиперплазия холангиол с пролиферирующим эпителием в печени; увеличение в крови билирубина, повышение активности аланин- и аспартатаминотрансфераз и др.). У самок-крыс с холестазом происходит удлинение сроков беременности в среднем на 1-2 дня по сравнению с контрольными. Крысята в группе «Холестаз» рождаются слабыми и менее жизнеспособными. Отмечалось запаздывание на 2-3 дня признаков общего развития животных: отлипание ушных раковин, открытие ушных проходов, появление шерстного покрова, прозревание и реализация позы стояния. При заборе материала у них, как и у их матерей с холестазом, отмечается желтизна внутренних органов, в частности, печени и серозных оболочек.

На 2-е сутки постнатального развития масса крысят, родившихся от матерей с холестазом, на 7% меньше, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), к 15-м суткам разница в массе между контролем и опытом достигает 15,2% ( $p < 0,05$ ), на 45-е сутки после рождения масса крысят в группе «Холестаз» в целом достигает нижних границ показателей контрольной группы и сохраняется на этом уровне вплоть до 90-х суток постнатального развития. Дефицит массы печени в группе «Холестаз» выявлен на 45-е сутки после рождения – на 24,9%, и сохраняется до 90-х суток (на 3,8%),  $p < 0,05$ .

**Гистология печени.** У крысят опытной группы на 2-е сутки после рождения выявляется значительное расширение и кровенаполнение как порталных сосудов, так и синусоидных капилляров. Отмечается меньшее количество очагов кроветворения, что, вероятно, связано с удлинением сроков беременности у крыс с холестазом. Выявляется большое количество двуядерных гепатоцитов. На 15-е сутки постнатального развития наблюдается некоторое нарушение организации паренхимы органа: гепатоциты располагаются беспорядочно даже в центре долек, где в норме балочная структура прослеживается наиболее четко. Наблюдается значительное расширение и кровенаполнение как порталных сосудов, так и синусоидных капилляров (рис. 1). У 45-суточного потомства животных с холестазом общий план строения печени существенно не отличался от контроля. Вместе с тем в печени опытных животных выявлялись гепатоциты, в цитоплазме которых присутствовали липидные капли разного размера. К 90-м суткам постнатального развития строение печени в опытной группе не отличается от контроля.



А



Б

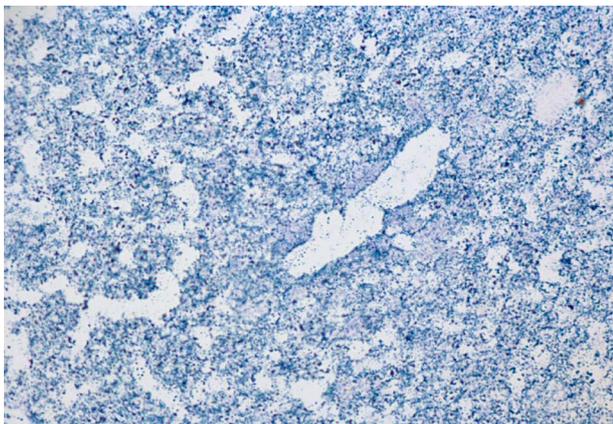
**Рисунок 1 – Классические печеночные дольки 15-суточных контрольных крысят (А) и крысят, рожденных в условиях холестаза (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200. Цифровая микрофотография**

**Морфометрия гепатоцитов.** У 15-суточных крысят с холестазом в периферической части классической печеночной дольки отмечается некоторое уменьшение размеров и округление гепатоцитов, а именно максимального диаметра на 4% ( $p = 0,04$ ) и фактора элонгации на 8% ( $p = 0,016$ ). У 45-суточного потомства животных с холестазом преимущественно страдает центральная зона печеночных долек. В ней отмечается уменьшение размеров гепатоцитов: их минимального на 18,6% ( $p = 0,028$ ) и максимального на 6,8% ( $p = 0,028$ ) диаметров, площади и периметра на 8,4% ( $p = 0,009$ ) и 10,9% ( $p = 0,028$ ), соответственно. На периферии долек не выявлено существенных различий в размерах и форме гепатоцитов между опытом и контролем. На 45-е сутки после рождения уменьшается площадь ядер у опытных животных на 26,6% ( $p = 0,009$ ) только в периферической части классической печеночной дольки. Увеличивается ядерно-цитоплазматическое соотношение периферических гепатоцитов: с 1:5 до 1:4 у опытных животных. Это свидетельствует о нарушении процессов дифференцировки гепатоцитов. На 90-е сутки постнатального развития размеры и форма клеток, их ядер у животных в опытной группе не отличаются от таковых показателей в контрольной группе.

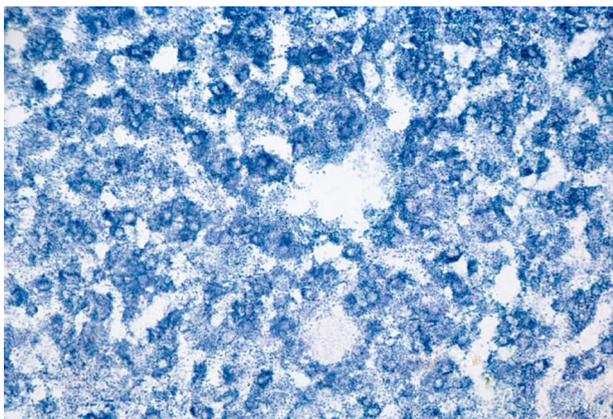
**Гистохимия.** Содержание гликогена в гепатоцитах опытных двухсуточных крысят в долке равномерное. В печени 15-суточных опытных крысят его

количество уменьшается, а у 45-суточного потомства выявляются лишь его следы в единичных гепатоцитах. Это может быть связано с нарушением углеводного обмена в печени. На 90-е сутки постнатального онтогенеза количество гликогена и расположение его в печеночной дольке существенно не различается между контрольной и опытной группами.

В гепатоцитах двухсуточных крысят с холестазом активность маркерного фермента митохондрий СДГ на 42,6% ниже, чем в контрольной группе, активность же другого маркерного фермента митохондрий НАДН-ДГ достоверно выше на 40% (рис. 2).



А



Б

**Рисунок 2 – Активность НАДН-ДГ в клетках печени двухсуточных контрольных крысят (А) и ее повышение в гепатоцитах у потомства крыс с подпеченочным холестазом (Б). Окраска по Нахласу и др. Ув. 200. Цифровая микрофотография**

На 15-е сутки постнатального развития активность НАДН-ДГ в группе «Холестаз» становится достоверно ниже на 40%, что говорит о нарушении в связующем звене между конечными продуктами распада углеродного скелета и дыхательной цепью. Активность маркерного фермента анаэробного гликолиза, ЛДГ, выше контрольных цифр на 32%, что

### Литература

1. Дудук, Н.И. Структурные и гистохимические изменения в печени 45-суточного потомства крыс с экспериментальным холестазом / Н.И. Дудук, С.М. Зиматкин // *Новости медико-биологических наук.* – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 49-53.
2. Дудук, Н.И. Коррекция морфофункциональных изменений печени потомства крыс с экспериментальным хо-

говорит о функциональном напряжении энергетического баланса клетки посредством усиления анаэробного окисления для компенсаторного поддержания жизнедеятельности клетки. Активность маркерного фермента лизосом, КФ выше, чем в контроле, на 24%, что можно рассматривать как проявление усиленной аутофагии, направленной на удаление поврежденных мембран и органелл. У 45-суточного потомства на периферии печеночных долек происходит статистически значимое снижение активности СДГ и ЛДГ, что говорит о сохранении нарушений энергетического метаболизма гепатоцитов. У 90-суточных животных группы «Холестаз» активность изучаемых ферментов не отличается от контроля, за исключением НАДН-ДГ – происходит статистически значимое повышение активности на 29,3%.

В раннем постнатальном развитии у крыс (первые 14 суток) наибольший вклад по сравнению с другими периодами вносят пролиферация и гипертрофия клеток, которая обусловлена увеличением числа и размеров органелл вследствие интенсификации функции печени. Заметный вклад в увеличение массы печени в период с 15-х по 60-е сутки вносит полиплоидизация и пролиферация гепатоцитов [5].

Уменьшение размеров клеток, угнетение активности сукцинатдегидрогеназы 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 печени значительных морфофункциональных нарушений.

### Выводы

1. Экспериментальный холестаз, вызванный на 17-е сутки беременности у самок-крыс, удлиняет срок беременности на 1-2 дня, при этом уменьшается масса крысят на 2-е и 15-е сутки постнатального развития (на 7 и 15%, соответственно) и масса печени на 45-е и 90-е сутки. У потомства крыс с холестазом нарушено строение печени: на 2-е и 15-е сутки после рождения нарушена балочная организация долек печени, расширены портальные сосуды и синусоидные капилляры; размеры гепатоцитов и их ядер меньше на 15-е и 45-е сутки после рождения, а к 90-м суткам строение печени нормализуется.

2. У потомства крыс с холестазом происходит нарушение метаболизма гепатоцитов. Гистохимические изменения в гепатоцитах носят разнонаправленный и волнообразный характер. Так, содержание гликогена на 2-е сутки повышено, а на 15-е и 45-е сутки – снижено, активность СДГ на 2-е и 45-е сутки понижена, НАДН-ДГ на 2-е и 90-е сутки повышена, а на 15-е – снижена; активность ЛДГ на 15-е сутки повышена, на 45-е – снижена; активность КФ на 15-е сутки повышена.

### Литература

1. Duduk, N.I. Strukturnye i gistohimicheskie izmeneniya v pečeni 45-sutochnogo potomstva krys s jeksperimental'nyh holestazom / N.I. Duduk, S.M. Zimatkin // *Novosti mediko-biologicheskikh nauk.* – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 49-53.
2. Duduk, N.I. Korrekciya morfofunkcional'nyh izmenenij pečeni potomstva krys s jeksperimental'nyh holestazom / N.I. Duduk, R.I. Kravchuk, S.I. Zimatkin // *Vesci NAN*

лестазом / Н.И. Дудук, Р.И. Кравчук, С.И. Зиматкин // Весці НАН Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2014. - № 3. – С. 78-83.

3. Структурно-метаболические последствия холестаза для взрослого и развивающегося организма / С.М. Зиматкин [и др.] // Журнал ГрГМУ. – 2008. - № 4. – С. 7-9.

4. Кизюкевич, Л.С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазе: монография / Л.С. Кизюкевич. – Гродно: ГрГМУ, 2005. – 239 с.

5. Кудрявцев, Б.Н. Клеточные механизмы нормального и репаративного роста печени млекопитающих: автореф. дис. на соискание уч. ст. д-ра мед. наук / Б.Н. Кудрявцев. – СПб, 1991. – 50 с.

6. Современные технологии в комплексном лечении внутривисцерального холестаза беременных / А.В. Николаева [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2009. - № 6. – С. 21-24.

7. Мацюк, Я.Р. Протективное действие урсодезокси-хололевой кислоты (УДХК) на измененные при холестазе матери структурные свойства органов потомства крыс / Я.Р. Мацюк и др. // Актуальные проблемы медицины: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (23 января 2014 г.) – Гродно: ГрГМУ. – 2014. – С. 159-160.

8. Мацюк, Я.Р. Холестаз беременных и органогенез потомства (экспериментальное исследование) / Я.Р. Мацюк и др. // Актуальные проблемы медицины. В 2-х частях: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (22 января 2013). – Гродно, ГрГМУ. – 2013. – Ч. I. - С. 61-64.

9. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М., 1965. – 929 с.

10. Шарапова, О.В. Медико-организационный анализ случаев материнской смертности / О.В. Шарапова, Н.Г. Баклаенко, Л.П. Королева // Здравоохранение. – 2007. - № 9. – С. 39-53.

11. Importance of bile acids for intrahepatic cholestasis of pregnancy / N. Favre [et al.] // Gynecol. Obstet. Fertil. – 2010. – Vol. 38(4). – P. 293-295.

12. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates / A. Glantz [et al.] // Hepatology. – 2004. - № 40. – P. 467-474.

13. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease / H. Reyes, FR. Simon // Semin. Liver Dis. – 1993. - № 13. – P. 289-301.

14. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis / G. Zollner [et al.] // Mol. Pharm. – 2006. – Vol. 3. - № 3. – P. 231-251.

Belarusi. Seryja medycynskih navuk. – 2014. - № 3. – S. 78-83.

3. Strukturno-metabolicheskie posledstvija holestaza dlja vzroslogo i razvivajushhegosja organizma / S.M. Zimatkin [i dr.] // Zhurnal GrGMU. – 2008. - № 4. – S. 7-9.

4. Kizjukevich, L.S. Reaktivnye izmenenija v pochkah pri jeksperimental'nom holestaze: monografija / L.S. Kizjukevich. – Grodno: GrGMU, 2005. – 239 s.

5. Kudrjavcev, B.N. Kletochnye mehanizmy normal'nogo i reparativnogo rosta pecheni mlekopitajushhih: avtoref. dis. na soiskanie uch. stepeni dok. med. nauk / B.N. Kudrjavcev. – SPb, 1991. – 50 s.

6. Sovremennye tehnologii v kompleksnom lechenii vnutriphechenochnogo holestaza beremennyh / A.V. Nikolaeva [i dr.] // Akusherstvo i ginekologija. – 2009. - № 6. – S. 21-24.

7. Macjuk, Ja.R. Protektivnoe dejstvie ursodezoksiholevoj kisloty (UDHK) na izmenennye pri holestaze materi strukturyne svojstva organov potomstva krysv / Ja.R. Macjuk i dr. // Aktual'nye problemy mediciny: materialy ezhegodnoj itogovoj nauchno-prakticheskoj konferencii (23 janvarja 2014 g.) – Grodno: GrGMU. – 2014. – S. 159-160.

8. Macjuk, Ja.R. Holestaz beremennyh i organogenez potomstva (jeksperimental'noe issledovanie) / Ja.R. Macjuk i dr. // Aktual'nye problemy mediciny. V 2-h chastjah: materialy ezhegodnoj itogovoj nauchno-prakticheskoj konferencii (22 janvarja 2013). – Grodno, GrGMU. – 2013. – Ch. I. - S. 61-64.

9. Pirs, Je. Gistohimija teoreticheskaja i prikladnaja / Je. Pirs. – M., 1965. – 929 s.

10. Sharapova, O.V. Mediko-organizacionnyj analiz sluchaev materinskoj smertnosti / O.V. Sharapova, N.G. Baklaenko, L.P. Koroleva // Zdravoohranenie. – 2007. - № 9. – S. 39-53.

11. Importance of bile acids for intrahepatic cholestasis of pregnancy / N. Favre [et al.] // Gynecol. Obstet. Fertil. – 2010. – Vol. 38(4). – P. 293-295.

12. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates / A. Glantz [et al.] // Hepatology. – 2004. - № 40. – P. 467-474.

13. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease / H. Reyes, FR. Simon // Semin. Liver Dis. – 1993. - № 13. – P. 289-301.

14. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis / G. Zollner [et al.] // Mol. Pharm. – 2006. – Vol. 3. - № 3. – P. 231-251.

## DYNAMICS OF MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN THE LIVER OF OFFSPRING OF RATS WITH EXPERIMENTAL CHOLESTASIS

*Duduk N.I., Zimatkin S.M.*

Educational Establishment «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

*The consequences of cholestasis of pregnancy on the development of the liver in the offspring have not been studied well. Using somatometric, histological, histochemical and statistical methods of research on 80 rat pups aged 2-90 days, it was found that obstructive cholestasis, experimentally induced in female rats on the 17th day of pregnancy delays liver development in their offspring, causes the impairment of its histological structure, size and hepatocyte metabolism.*

**Key words:** pregnancy, cholestasis, offspring, liver.

Адрес для корреспонденции: [duduk.natalya@mail.ru](mailto:duduk.natalya@mail.ru)

Поступила 28.08.2014