

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТАЗА МАТЕРИ НА ПЕЧЕНЬ ДВУХСУТОЧНЫХ КРЫСЯТ И КОРРЕКЦИЯ ПАТОЛОГИИ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ

Н.И. Дудук

Гродненский государственный медицинский университет

Заболевания печени являются одними из самых распространенных хронических болезней беременных [3]. В связи с повышением нагрузки на печень и нарастанием уровня женских половых гормонов в третьем триместре беременности у женщин иногда развивается застой желчи (холестаз). При этом происходит накопление желчных кислот, билирубина и холестерина в крови [6].

Урсодезоксихолевая кислота (УДХК) — естественная нетоксичная гидрофильная желчная кислота, являющаяся составной частью пула желчных кислот. Основными механизмами действия УДХК являются цитопротективный и холеретический эффекты, обусловленные изменением пула желчных кислот с вытеснением УДХК токсических первичных желчных кислот (хенодеоксихолевая и др.), всасывание которых в кишечнике тормозится. УДХК обладает также антиапоптозным и антиоксидантным эффектом [5, 7].

Цель работы — выяснение влияния подпеченочного холестаза, вызванного у самок-крыс на 17-е сут беременности, на морфофункциональное состояние печени двухсуточного потомства и выяснение возможности коррекции выявленных нарушений средством УДХК («Урсофальк»).

Материал и методы. В работе использован материал от 30 беспородных белых крысят двухсуточного возраста. 20 крысят — потомство животных с экспериментальным подпеченочным холестазом, вызванным на 17-е сут беременности путем наложения лигатуры на верхнюю часть общего желчного протока [1]. Десять из них взяты от самок, которые с 17-х сут беременности и в течение 7 сут после родов получали «Урсофальк» с

пищей в дозе 50 мг/кг/сут; 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). Экспериментальных животных подвергали эвтаназии парами эфира с последующей декапитацией, извлекали и взвешивали печень. Один кусочек печени каждого животного фиксировали в жидкости Карнуа; парафиновые срезы окрашивали гематоксилином, эозином и по методу Шабадаша для выявления нейтральных гликопротеинов. Другой образец печени замораживали в жидком азоте; срезы толщиной 10 мкм готовили в криостате фирмы «Leica CM 1850» при 20°C и использовали для определения в гепатоцитах активности сукцинатдегидрогеназы по Nachlas M. et al. (1957), лактатдегидрогеназы по Hess R. et al. (1958), НАДН-дегидрогеназы по Nachlas M. et al. (1958), глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы по Hess R. et al. (1958) и кислой фосфатазы по Gomori G. (1946) [4]. Для электронно-микроскопического исследования кусочки печени фиксировали в OsO₄, изготавливали ультратонкие срезы, контрастировали солями тяжелых металлов и изучали их в электронном микроскопе. Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью лицензионной программы Statistica 6.0. Достоверными считали различия между группами при значениях $p < 0,05$ (Mann–Whitney U-test).

Результаты и их обсуждение. Гистологически у крысят группы сравнения на 2-е сут после рождения печень покрыта тонкой соединительнотканной капсулой. В больших количествах встречаются очаги кроветворения. Нередко встречаются двуядерные гепатоциты. Печеночные балки и синусоидные капилляры имеют извитой ход, нет их четкого радиального расположения. В печени двухсуточных крысят выявляется большое количество гликогена, который располагается преимущественно на периферии печеночных долек. На электронно-микроскопическом уровне в цитоплазме гепатоцитов хорошо развиты все органеллы, особенно гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), отмечается большое количество липидных капель, единичные лизосомы. В клетках хорошо сформированы билиарный и сосудистый полюса гепатоцитов. Митохондрии имеют овальную форму и примерно одинаковый размер. Большинство гепатоцитов светлые, встречаются единичные темные и промежуточные печеночные клетки.

У самок-крыс с холестазом происходит удлинение сроков беременности в среднем на 1–2 дня по сравнению с контрольными животными. При морфологическом исследовании их печени отмечается большое количество холангиол с пролиферирующим эпителием, что является подтверждением холестаза. Крысята в группе «холестаз» рождаются слабыми и менее жизнеспособными. Масса крысят, родившихся от матерей с холестазом, на 7% меньше, чем в группе сравнения. У них в печени выявляется значительное расширение и кровенаполнение портальных сосудов и синусоидных капилляров. Отмечается меньшее количество очагов кроветворения, чем в группе сравнения. Появляется большее количество двуядерных гепатоцитов. В печени увеличивается количество гликогена, розетки которого располагаются в дольке равномерно. Активность СДГ в гепатоцитах потомства крыс с холестазом ниже, чем в группе сравнения на 42,6%. Активность НАДН-ДГ в группе «холестаз» достоверно выше на 40%.

По данным электронной микроскопии, в печени крысят, родившихся от матерей с холестазом, резко увеличивается количество темных и промежуточных гепатоцитов. Значительно уменьшается содержание липидных включений в цитоплазме гепатоцитов. ГрЭС более выражена по сравнению с контролем, однако ее цистерны содержат меньше рибосом. Увеличивается количество лизосом. Наблюдается полиморфизм митохондрий, отмечается тенденция к увеличению их средней площади, повышается число очень крупных митохондрий (мегамитохондрий). Встречаются митохондрии с просветленным матриксом и разрушенными кристами. Зачастую крупные митохондрии скапливаются вблизи ГрЭС и окружают «гликогеновые поля». Относительная площадь митохондрий увеличивается по отношению к контролю (таблица). В желчных канальцах обнаруживаются элементы желчи.

Таблица

Показатели размеров, формы и количества митохондрий в цитоплазме гепатоцитов контрольных и опытных животных (Me + IQR)

Изучаемые параметры	Контроль	Холестаз	Холестаз + Урсофальк
Площадь, мкм ²	0,329±0,030	0,370±0,048	0,480±0,022↑ * #
Периметр, мкм	2,447±0,110	2,620±0,161	2,917±0,132↑ *
Форм-фактор	0,687±0,025	0,683±0,035	0,707±0,026
Фактор элонгации	2,033±0,193	2,058±0,176	1,878±0,124↓ * #
Относительная площадь, мкм ² /100 мкм ²	15,860±2,414	19,100±4,149↑*	23,783±1,702↑ * #
Кол-во, штук/100 мкм ²	49,060±5,706	51,700±7,309	50,117±5,090

Примечание — ↑Статистически значимое увеличение изучаемого параметра; ↓ — статистически значимое снижение изучаемого параметра; * $p < 0,05$ при сравнении с контролем; # $p < 0,05$ при сравнении с холестазом.

В группе «урсофальк» масса крысят на 2,3% выше, чем в группе «холестаз» и достоверно не отличается от группы сравнения. Масса печени в данной группе составляет 0,291 г, что на 23% больше, чем в группах «контроль» и «холестаз». Синусоидные капилляры умеренно расширены. Сохраняется меньшее количество очагов кроветворения. Нормализуется распределение гликогена: он располагается, как и в контроле, преимущественно на периферии печеночной дольки. Активность СДГ в цитоплазме гепатоцитов нормализуется. Активность НАДН-ДГ остается достоверно повышенной. Результаты электронно-микроскопического исследования показали, что у этих крысят отмечается большое количество обширных «гликогеновых полей». Светлые клетки преобладают над темными и промежуточными и в них повышается число лизосом. Происходит увеличение средней площади, периметра и фактора элонгации митохондрий. Существенно возрастает содержание липидных включений, которое приближается к уровню в группе сравнения и отмечается их тесный контакт с митохондриями. Комплекс Гольджи хорошо развит.

Уменьшение количества очагов кроветворения в печени крысят группы «холестаз» вероятно связано с удлинением сроков беременности у самок. Появление у них большого числа двуядерных гепатоцитов свидетельствует об активизации регенераторных процессов в печени. Активность фермента аэробного распада углеводов в цитратном цикле, СДГ, в группе «холестаз» снижается, что указывает на угнетение цикла Кребса в гепатоцитах. Характер ультраструктурных нарушений в гепатоцитах соответствует выявленным на светооптическом уровне гистохимическим изменениям. Снижение активности СДГ и ультраструктурные повреждения митохондрий указывают на угнетение митохондриальных энергетических процессов в цитоплазме гепатоцитов в группе «холестаз». Наличие большого количества темных и промежуточных клеток косвенно свидетельствует об усилении в печени регенераторных процессов. Темные гепатоциты отличаются от светлых высоким энергетическим потенциалом митохондрий и более активным синтезом АТФ. Необходимо отметить, что темные и светлые клетки не являются различными субпопуляциями клеток, а представляют собой переменные клеточные состояния, различающиеся энергетической активностью [2]. Меньшее количество липидных капель в группе «холестаз» возможно связано с нарушением всасывания липидов в кишечнике матери и может приводить к нарушению энергетического обеспечения гепатоцитов. Увеличение количества лизосом в гепатоцитах крысят группы «холестаз» и тенденция к повышению активности КФ в цитоплазме гепатоцитов может свидетельствовать о некотором усилении процессов аутофагии, направленных на удаление разрушенных органелл и мембран. Выявляемые в цитоплазме гепатоцитов после введения «Урсофалька» очень крупные митохондрии вероятно могут быть гиперфункциональными. Изменение же размеров и формы митохондрий говорит о возможных компенсаторных изменениях в энергетическом аппарате клеток [6].

Заключение. Таким образом, экспериментальный холестаз матери во время беременности оказывает значительное влияние на развитие и становление функций печени двухсуточного потомства. Используемый с целью коррекции данной патологии средство «Урсофальк» частично восстанавливает структуру и метаболизм гепатоцитов, что подтверждает цитопротективное и мембраностабилизирующее действие урсодезоксихолевой кислоты.

INFLUENCE OF MATERNAL CHOLESTASIS IN THE LIVER OF TWO-DAY RAT PUPS AND CORRECTION THIS DISTURBANCE WITH URSODEOXYCHOLIC ACID

N.I. Duduk

The purpose of research — to clarify the influence of maternal experimental cholestasis on liver development of a two-day offspring and the possibility to correct those violations by “Ursofalk”. In this paper we used material from 30 inbred albino rats, histological, histochemical, morphometric and electronic microscopy methods of investigation. Under the influence of maternal cholestasis in the liver of two-day offspring the extension of sinusoid capillaries, in the cytoplasm of hepatocytes a reduction succinate dehydrogenase activity and increased activity of NADH — dehydrogenase was revealed. The development of significant ultrastructural disturbances (lipid droplets disappear, increased heterogeneity of size and shape of mitochondria, increases number of lysosomes). Preparation “Ursofalk” partially restores the structure and metabolism of hepatocytes.

Литература

1. Кизюкевич, Л.С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазе / Л.С. Кизюкевич. — Гродно: ГрГМУ, 2005.
2. Косых, М.И. Структурно-функциональные различия темных и светлых гепатоцитов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.И. Косых. — М., 1991. — 25 с.
3. Кулавский, Б. Беременность и заболевания гепатобилиарной системы / Б. Кулавский, М. Наргайлаков // Актуальные проблемы гепатологии: материалы Межрегион. конф., посвящ. 70-летию проф. И.А. Сафина. — Уфа, 2002. — С. 142–143.
4. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. — М.: Инстр. лит., 1962.
5. Kondrackiene, J. Efficacy and safety of Ursodeoxycholic Acid versus Cholestyramine in intrahepatic cholestasis of pregnancy / J. Kondrackiene, U. Beuers, L. Kupcinskas // Gastroenterol. — 2005. — Vol. 129. — P. 894–901.

6. Palmeira, C.M. Mitochondrially – mediated toxicity of bile acids / C.M. Palmeira, A.P. Rolo // *Toxicol.* — 2004. — № 11. — P. 1–15.

7. Reyes, H. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy / H. Reyes, Y. Sjoall // *Ann. Med.* — 2000. — Vol. 32, № 2. — P. 94–106.