

УДК [616.36:611.013.85]:616.36-008.811.6-085.244]-092.9

Я. Р. МАЦЮК, О. В. БАРАБАН

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЛАЦЕНТЫ КРЫС В ПРЕДРОДОВЫЙ ПЕРИОД ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХОЛЕСТАЗЕ

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь,
e-mail: matsiuk39@mail.ru, baraban.olga@tut.by*

Показано, что введение урсодезоксихолевой кислоты самкам с моделируемым на 17-й день беременности подпеченочным обтурационным холестазом существенно не влияет на ход генетически обусловленных процессов, связанных с родами, но оказывает протективный эффект не только на сосудистое звено плаценты, но и на цитохимические изменения в ее клеточных элементах.

Ключевые слова: беременность, холестаз, плацента, морфология, урсодезоксихолевая кислота, крыса.

Ya. R. MATSIUK, O. V. BARABAN

MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF THE PLACENTA OF RATS IN THE PRENATAL PERIOD WITH EXPERIMENTAL CHOLESTASIS

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus, e-mail: matsiuk39@mail.ru, baraban.olga@tut.by

It is found that the administration of UDCA to females with obstructive cholestasis, which has been modeled on the 17th day of gestation, does not change significantly the course of genetically determined processes associated with childbirth, but has a protective effect on the vascular link of the placenta changed during cholestasis and on cytochemical disturbances of its cellular elements.

Keywords: pregnancy, cholestasis, placenta, morphology, ursodeoxycholic acid, rat.

Введение. Развитие организма и его органов в раннем постнатальном периоде и особенно в пренатальном проходит весьма быстрыми темпами и очень чувствительно к воздействиям не только внешних, но и внутренних факторов [1]. В результате клинических и экспериментальных исследований установлено, что холестатическое состояние матери отрицательно воздействует на течение беременности, плодовитость, вызывая преждевременные роды [2, 3], сопровождаемые иногда летальным исходом [4], задержку физического развития родившегося потомства, снижение его резистентности и жизнеспособности [5, 6], нарушение становления структурных и цитохимических свойств его органов [7–9]. Механизм этого явления сложен и окончательно не установлен. Известно лишь, что при холестазе в сыворотке крови имеет место увеличение содержания щелочной фосфатазы, билирубина, зачастую ферментов печени и особенно желчных кислот (в 10–100 раз) [2, 10–12], а дезинтоксикационная функция печени при этом снижена [13]. Эти факторы, вероятно, и составляют эндогенную интоксикацию при холестазе.

Поскольку воздействие этих факторов на плод в системе мать–плод осуществляется через плаценту, в последней при холестазе в период интенсивного фетогенеза выявлены изменения как со стороны ее сосудистого звена, так и со стороны ее клеточного состава [14]. На выявленные изменения, как установлено впервые в работе [15], оказывает протективный эффект урсодезоксихолевая кислота (УДХК). Она имеет немало преимуществ в сравнении с другими препаратами, применяемыми при терапии холестаза беременных, и является совершенно безопасной не только для матери, но и для плода [16–19].

Какое воздействие оказывает УДХК на измененные при холестазах беременных морфофункциональные свойства плаценты в предродовой период, имеющие, вероятно, отношение к преждевременным родам, не выявлено [14]. Установлено лишь, что введение УДХК холестатическим самкам крыс в период интенсивного фетогенеза приводит к рождению потомства большей массы [15]. Изучение этого вопроса имеет не только научную, но и практическую значимость, так как будет способствовать нормализации при холестазах течения беременности и преждевременных родов, что даст возможность получить здоровое потомство.

Цель работы – выявить корректирующее действие урсодезоксихолевой кислоты на структуру плацент крыс в условиях холестаза беременных в предродовой период.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведен на 29 беременных самках беспородных белых крыс массой 180–200 г, разбитых на три группы. У 20 самок на 17-й день беременности экспериментально моделировали подпеченочный обтурационный холестаз [20]. Из них во вторую группу вошли 10 самок с моделируемым холестазом, в третью группу – 10 самок, которым с момента создания холестатического состояния ежедневно вводили УДХК (урсофальк; Freiburg: Dr. Falk Pharma GmbH) в дозе 50 мг/кг в утренние часы перорально с пищей. В первую группу, служившую контролем, вошли 9 самок, у которых в этот срок беременности производили лишь лапаротомию, без наложения лигатуры на общий желчный проток. Всех самок контрольной и опытных групп содержали в одинаковых условиях вивария со свободным доступом к пище и воде.

В предродовом периоде на 21-е сутки беременности самок всех групп взвешивали, усыпляли в парах эфира и декапитировали. После лапаротомии осматривали рога матки, оценивали внешний вид плацент и плодов с последующим определением их абсолютной массы.

От каждой самки для исследований забирали 1–2 плаценты. Последние разрезали по срединной линии пополам. Одни половинки плацент животных контрольной и опытных групп после фиксации в жидкости Карнуа или холодном ацетоне заключали в парафин по принципу «контроль – холестаз – холестаз + УДХК». Изготовленные одновременно со средней части плацент самок контрольной и опытных групп парафиновые срезы толщиной 5 мкм после окраски гематоксилином и эозином использовали для гистологических и морфометрических исследований. В срезах толщиной 10 мкм после окраски по L. Einarson в клеточных элементах плацент определяли содержание рибонуклеопротеинов (РНП). На парафиновых срезах плацент, фиксированных в холодном ацетоне, определяли локализацию и активность щелочной фосфатазы (фосфогидролита моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.1; по Гомори, 1952, ЩФ) [21].

Другие половинки плацент сразу после забора подвергали глубокому замораживанию в жидком азоте с последующим монтированием их на объектодержатели криостата по принципу «контроль – холестаз – холестаз + УДХК». Изготовленные в криостате Leica CM-1850 при температуре -15°C срезы толщиной 10 мкм использовали для определения в клеточных элементах органа активности сукцинатдегидрогеназы (сукцинат: акцептор-оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1; по Нахласу и др., 1957, СДГ); лактатдегидрогеназы (L-лактат: НАДН-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс и др., 1958, ЛДГ); НАДН-дегидрогеназы (НАДН: акцептор-оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3; по Нахласу и др., 1958, НАДН-ДГ) и кислой фосфатазы (фосфогидролита моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2; по Гомори, 1950, КФ). Все цитохимические реакции сопровождалось бесубстратными контролями [21].

Полученные гистологические и цитохимические препараты подвергали морфометрическому и цитофотометрическому исследованию. Для этих целей использовали компьютерный анализатор изображений с программой Image Warp (Bit Flow, США), микроскоп Axioscop 2 plus (C. Zeiss, Германия) с цифровой видеокамерой Leica DFC 320 (Германия). Из каждой плаценты самок контрольной и опытных групп использовали 5–6 серийных срезов. Размер структур оценивали в микрометрах (мкм), а активность ферментов – в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.).

Полученный цифровой материал обрабатывали методами непараметрической статистики с применением компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows. В описательной статистике для каждого показателя определяли значение медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью *U*-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Различия между показателями самок контрольной и опытных групп считали достоверными, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Исследования показали, что на 21-е сутки беременности самки опытной группы, которым с момента моделирования подпеченочного обтурационного холестаза ежедневно перорально с пищей вводили УДХК, отличались незначительно большей массой тела ($301,6 \pm 6,0$ г), нежели самки, не принимавшие ее ($282,5 \pm 1,1$ г), при $292,0 \pm 1,8$ г в контроле. Аналогичная закономерность прослеживалась у взятых у них плодов и плацент (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Абсолютная масса 21-дневных плодов крыс и плацент в контрольной и опытных группах, $Me \pm IQR$

Объект исследования	Контроль	Холестаз	Холестаз + УДХК
Плоды, г	$3,59 \pm 0,68$	$2,30 \pm 1,34^{**}$	$3,60 \pm 0,70$
Плаценты, мг	$533,5 \pm 126,5$	$481,5 \pm 172,0^*$	$542,0 \pm 165,0$

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий при сравнении с контрольной группой: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Помимо этого, плоды, полученные от холестатических самок, отличались желтизной кожного покрова, а их плаценты имели мраморную желто-зеленую окраску, особенно в области входа пуповины в ее лабиринтный отдел. Плоды, взятые от холестатических самок, которым вводили УДХК, отличались менее выраженной желтушностью кожного покрова или отсутствием последней, а их плаценты, за редким исключением, не имели мраморного желто-зеленого окрашивания. Уменьшена желтушность амниотических и желточных оболочек. Несмотря на снижение массы плацент плодов, взятых у самок с моделируемым холестазом, на 21-й день беременности процентное соотношение площадей материнского и детского отделов не отличалось от такового в контроле. При приеме этими самками УДХК доля материнского отдела в плацентах уменьшалась, а детского (лабиринтного) увеличивалась (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Процентное соотношение площадей материнского и детского отделов в плаценте на 21-е сутки беременности самок контрольной и опытных групп, $Me \pm IQR$

Отдел плаценты	Контроль	Холестаз	Холестаз + УДХК
Материнский	22 ± 3	22 ± 3	$18 \pm 4^{***}$
Детский	78 ± 3	78 ± 3	$82 \pm 4^{***}$

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий: ** – $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой; * – $p < 0,05$ при сравнении с группой с холестазом.

По данным морфометрии, в материнском отделе ширина лакун, собирающих кровь от венозных синусов лабиринтного отдела, была больше, чем при холестазе. Активность ЩФ в эндотелиоцитах лакун, переполненных кровью, существенно не менялась или незначительно снижалась, но оставалась довольно высокой. Лакуны желточного мешка существенно не расширялись, содержали малое количество клеток крови, находящихся на стадии эритро- и миелобластов. Активность ЩФ в эндотелиоцитах лакун желточного мешка не обнаруживалась. Не выявлялась она и в дифференцирующихся клетках крови желточного мешка.

Численная плотность клеток трофобласта на единицу площади материнского отдела плаценты, которая была снижена при холестазе, при воздействии УДХК возрастала и даже превышала уровень контроля (табл. 3). Эти клетки локализовались в основном по периферии губчатого слоя на границе с миометрием. Однако значительная часть клеток трофобласта уменьшена в размерах, что подтверждается данными их периметра и площади. Цитоплазма многих клеток трофобласта подвержена явлению микровакуолизации, что снижало их тинкториальные свойства. Уменьшен и размер ядер (табл. 3). Их ядрышки становились компактными, гомогенной консистенции, с выраженными базофильными свойствами и занимали в ядрах, как правило, центральное положение. Многие из клеток трофобласта подвержены лизису инфильтрирующими нейтрофилами. Активность в них СДГ при введении УДХК существенно не менялась, а ЛДГ, НАДН-ДГ проявляла тенденцию к увеличению. Активность КФ, несмотря выявленные деструктивные изменения, проявляла тенденцию к уменьшению (см. рисунок).

Таблица 3. Структурные показатели плаценты крыс в предродовый период при холестазе и воздействии УДХК, Me ± IQR

Отдел	Показатель	Контроль	Холестаз	Холестаз + УДХК
Губчатый (материнская часть)	Количество клеток трофобласта на 0,1 мм ²	2,12 ± 1,32	1,32 ± 1,06**	2,38 ± 1,06***
	Площадь клеток, мкм ²	1390,70 ± 1126,50	1262,80 ± 1107,82	1260,70 ± 1106,07
	Периметр клеток, мкм	192,77 ± 73,95	172,12 ± 80,04	154,94 ± 114,23*
	Средний диаметр ядра, мкм	26,24 ± 9,65	24,15 ± 6,51*	22,64 ± 9,71*
	Периметр ядра, мкм	93,12 ± 35,43	85,20 ± 20,38**	72,71 ± 28,13****
	Количество децидуальных клеток на 0,1 мм ²	146,86 ± 23,08	126,76 ± 25,13**	113,29 ± 33,57***
	Площадь клеток, мкм ²	199,58 ± 69,79	178,42 ± 38,62	239,06 ± 90,74****
	Периметр клеток, мкм	56,86 ± 14,32	56,15 ± 9,63	64,85 ± 14,92****
	Средний диаметр ядер, мкм	8,95 ± 3,00	9,43 ± 1,97	10,66 ± 1,78**
	Периметр ядер, мкм	30,56 ± 8,68	32,21 ± 7,89	35,95 ± 7,97****
Лабиринтный (детская часть)	Диаметр кровеносных лакун, мкм	44,56 ± 24,56	37,72 ± 28,62	42,00 ± 14,19
	Диаметр венозных синусов, мкм	17,06 ± 4,83	11,51 ± 4,07***	19,41 ± 5,63***
	Диаметр капилляров аллантаоиса, мкм	6,36 ± 3,14	6,19 ± 1,36	7,21 ± 2,98*
	Количество клеток Кашенко–Гофбауэра на 0,1 мм ²	26,89 ± 4,30	37,77 ± 4,20***	31,47 ± 10,49
	Площадь клеток, мкм ²	133,85 ± 64,01	188,58 ± 77,68**	195,95 ± 58,91***
	Периметр клеток, мкм	49,19 ± 12,39	56,25 ± 9,61**	60,40 ± 8,29****
	Средний диаметр ядер, мкм	8,85 ± 4,42	11,59 ± 2,22**	11,33 ± 1,22***
Периметр ядер, мкм	33,87 ± 11,78	41,39 ± 9,61***	40,58 ± 5,26***	

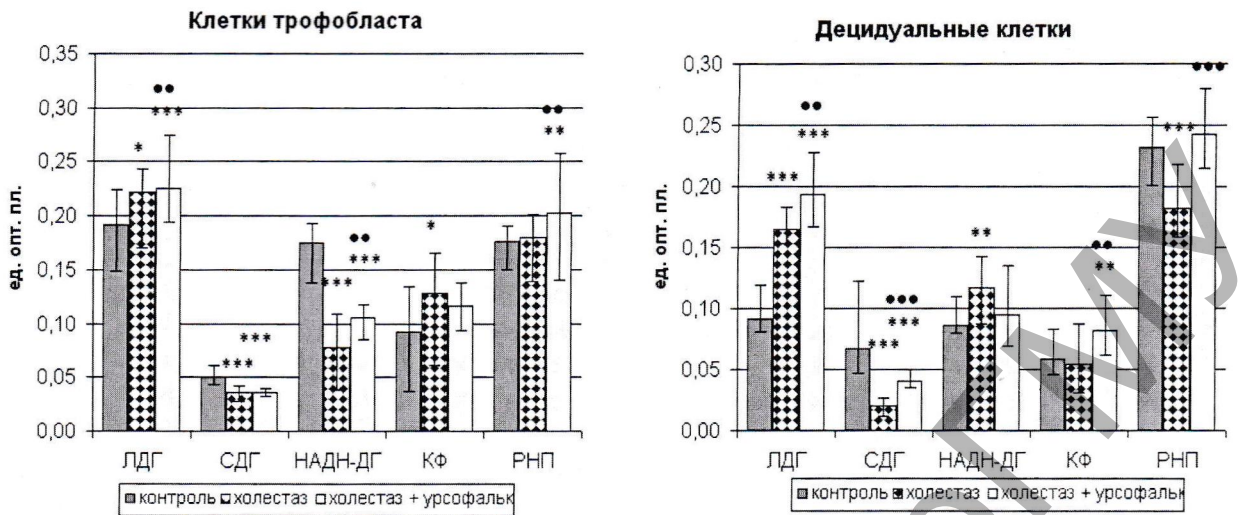
Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ при сравнении с группой с холестазом.

Число децидуальных клеток на единицу площади материнской части плаценты, постоянно уменьшающееся к концу нормально протекающей беременности [22], при введении УДХК холестатическим самкам сохраняло указанную выше тенденцию (табл. 3). Это наблюдалось даже при сравнении с плацентами контрольных самок. Децидуальные клетки отличались полиморфизмом. Однако площадь клеток значительно увеличивалась, как и размеры их ядер, а выраженность деструктивных изменений со стороны цито- и кариоплазмы была незначительной. Цитоплазма из-за явлений микровакуолизации приобретала пенистый вид со слабооксифильной окраской. Хроматин в ядрах, как и при холестазе, сохранял крупноглыбчатый характер и неравномерное распределение по кариоплазме. Ядрышки маленькие, расположенные, как правило, в центре. Нередко встречались клетки с делящимися ядрами, двуядерные или с ядрами, подверженными пикнозу. Активность в децидуальных клетках СДГ, ЛДГ, а также КФ при введении УДХК возрастала, а НАДН-ДГ снижалась до уровня нормы. Увеличивалось до контрольного уровня и содержание РНП (см. рисунок).

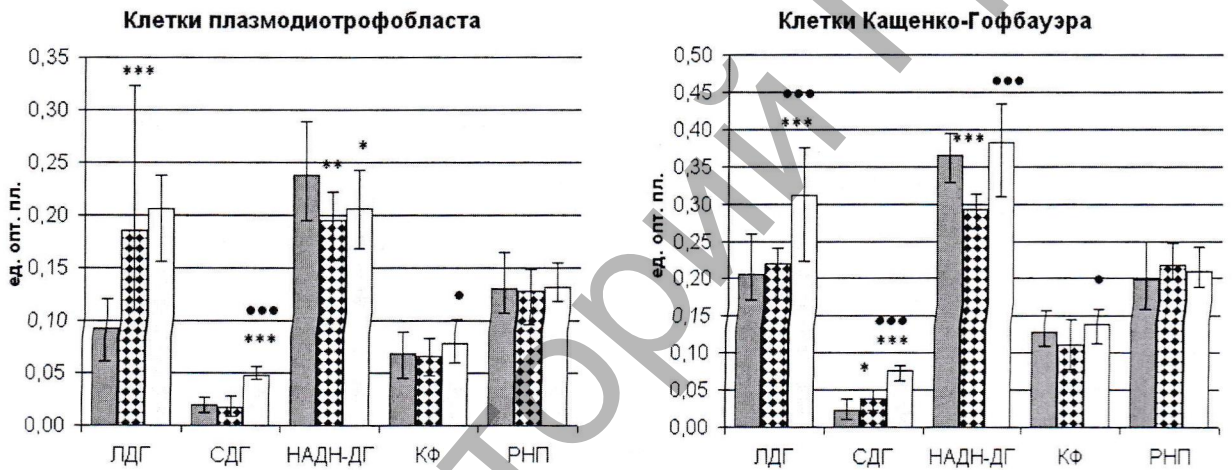
Увеличение доли лабиринтного (детского) отдела в плаценте холестатических самок после введения УДХК на 21-й день беременности происходило за счет ее сосудистого звена – просветы венозных синусов, несущих материнскую кровь, и аллантаидальных капилляров с кровью плода были повсеместно расширены и полнокровны. Эти расширения, как показали данные морфометрии, выявлены не только в сравнении с показателями самок с холестазом, но даже превышали уровень таковых в плаценте контрольных плодов. Выстилающие их эндотелиоциты были слегка отечны. Активность в них ЩФ несколько снижена, но еще довольно выражена. Незначительно отечны и клетки плазмодиотрофобласта, расположенные вокруг соединительнотканых прослоек, окружающих аллантаидальные капилляры. Активность в них ЛДГ, НАДН-ДГ, КФ и особенно СДГ проявляла тенденцию к увеличению. Возрастало и содержание РНП (см. рисунок).

Введение холестатическим самкам УДХК незначительно снижало увеличенное в лабиринтном отделе число клеток Кашенко–Гофбауэра, располагающихся в нежных соединительнотканых прослойках вокруг аллантаидальных капилляров и в разной степени вдающихся в просвет венозных синусов, несущих материнскую кровь. Однако их число на единицу площади оставалось

Материнская часть плаценты



Детская часть плаценты



Активность ферментов и содержание РНП в клетках плаценты крыс контрольной и опытных групп на 21-е сутки беременности ($Me \pm IQR$). * $-p < 0,05$, ** $-p < 0,01$, *** $-p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой; * $-p < 0,05$, ** $-p < 0,01$, *** $-p < 0,001$ при сравнении с холестатической группой

выше такового у плацент контрольных плодов (см. табл. 3). Клетки Кашенко-Гофбауэра отличались выраженным полиморфизмом. Нередко среди них встречались делящиеся путем перетяжки клетки и двуядерные формы. В ядрах, которые отличались выраженными базофильными свойствами, располагались 1-2 ядрышка, занимающие чаще всего центральное положение. Выраженных структурных изменений в цитоплазме, за исключением незначительных микровакуолизаций, не наблюдалось. Активность ЛДГ, НАДН-ДГ, сниженная при холестазе, оставалась без изменений, активность СДГ значительно возрастала, оставалась увеличенной и КФ. Содержание РНП существенно не менялось (см. рисунок). Однако продукты гистохимических реакции в клетках Кашенко-Гофбауэра приобретали мелкогранулярный характер (в основном при воздействии УДХК) вместо крупноглыбчатого при холестазе.

Клетки цитотрофобласта, расположенные снаружи в начале ветвления аллантаидальных сосудов, в лабиринтном отделе уменьшались в высоте, снижались их тинкториальные свойства, а лежащая под ними базальная мембрана утолщалась. Активность в них ЛДГ, НАДН-ДГ оставалась сниженной, активность СДГ значительно возрастала, а КФ оставалась увеличенной. Содержание РНП в клетках цитотрофобласта проявляло тенденцию к еще большему уменьшению.

Заключение. Введение в предродовом периоде УДХК не изменяло в плаценте генетически обусловленных процессов в связи с предстоящими родами, но оказывало некоторый протективный эффект на изменения в органе, вызванные холестатической интоксикацией экспериментально моделируемого холестаза у матери в период интенсивного фетогенеза. В первую очередь препарат оказывал положительное влияние в плаценте на сосудистое звено, способствуя расширению просвета лакун в материнском отделе, венозных синусов в детском (лабиринтном) отделе, несущих кровь матери, и расположенных между ними аллантаидальных капилляров, несущих кровь плода. Это улучшало доставку к плоду трофического материала и способствовало развитию и увеличению массы плода, что подтверждают ранее проведенные нами исследования [22]. В значительной мере проявлялась тенденция не только к нормализации численной плотности клеточных элементов в материнском и детском отделах плаценты, но и их размеров при уменьшении в них деструктивных изменений, вызванных холестазом. Отмечалась тенденция к нормализации в них цитохимических свойств: возрастала сниженная холестатическим состоянием активность СДГ и ЛДГ (как ферментов, отвечающих за энергетические процессы клеток), КФ (свидетельствующая об адаптивных и регенерационных внутриклеточных механизмах), а также содержание РНП в связи с необходимостью увеличения белкового синтеза для реализации указанных выше процессов.

Список использованной литературы

1. Хворик, Н. В. Влияние урсодезоксихолевой кислоты на течение и исход родов у беременных с внутрипеченочным холестазом / Н. В. Хворик, В. А. Лискович, И. Н. Недведская // Мед. новости. – 2009. – № 15. – С. 45–47.
2. Шумскене, И. Гепатологические и акушерские аспекты внутрипеченочного холестаза беременных / И. Шумскене, Л. Купчинский, Ю. Кондракене // Гастробюллетень. – 2001. – № 1. – С. 12–14.
3. Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid and S-adenosylmethionin in the treatment of intrahepatic cholestasis of pregnancy / R. L. Nicastri [et al.] // Br. J. Obstet. Gynecol. – 1998. – Vol. 105. – P. 1205–1207.
4. Шляхова, Г. Н. Патология печени и беременность / Г. Н. Шляхова // Экстрагенитальная патология и беременность: сб. тр. / под ред. Г. Г. Орловой. – Саратов, 1992. – С. 64–71.
5. Показатели крови, неспецифической резистентности и прооксидантно-антиоксидантного равновесия у потомства крыс, родившихся в условиях холестаза / Я. Р. Мацюк [и др.] // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2010. – № 2. – С. 24–27.
6. Влияние урсофалька на неспецифическую резистентность и перекисное окисление липидов у крысят, родившихся в условиях холестаза / Я. Р. Мацюк [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2011. – № 3. – С. 73–78.
7. Мацюк, Я. Р. Особенности структурных и цитохимических свойств собственных желез желудка 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза, экспериментально вызванного в период фетогенеза / Я. Р. Мацюк, Е. Ч. Михальчук // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2007. – № 2. – С. 46–49.
8. Мацюк, Я. Р. Морфофункциональные особенности женской репродуктивной системы 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза, вызванного в период фетогенеза / Я. Р. Мацюк, С. Я. Гудинович, Л. С. Кизюкевич // Вес. НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2008. – № 2. – С. 99–104.
9. Чернышевич, Ю. Н. Структурные и цитохимические свойства подвздошной кишки крысят при холестазе матери / Ю. Н. Чернышевич, Я. Р. Мацюк // Новости мед.-биол. наук. – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 112–118.
10. Шехтман, М. М. Экстрагенитальная патология у беременных / М. М. Шехтман. – М.: Медицина, 1987. – 296 с.
11. Кизюкевич, Л. С. Состояние тканевого гомеостаза почечной паренхимы через 24 часа от начала моделирования внепеченочного обтурационного холестаза / Л. С. Кизюкевич, О. Е. Кузнецов, И. Э. Гуляй // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2011. – № 4. – С. 94–97.
12. Кизюкевич, Л. С. Состояние тканевого гомеостаза почечной паренхимы через 72 часа от начала моделирования внепеченочного обтурационного холестаза / Л. С. Кизюкевич, О. Е. Кузнецов, И. Э. Гуляй // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2011. – № 1. – С. 42–45.
13. Савченко, Ю. И. Очерки физиологии и морфологии функциональной системы «мать–плод» / Ю. И. Савченко, К. С. Любинцев. – М.: Медицина, 1980. – 254 с.
14. Мацюк, Я. Р. Цитохимические характеристики плаценты крыс с подпеченочным обтурационным холестазом (экспериментальное исследование) / Я. Р. Мацюк, О. В. Барабан, С. Я. Гудинович // Вес. НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2013. – № 4. – С. 58–64.
15. Мацюк, Я. Р. Протективный эффект урсодезоксихолевой кислоты при холестазе в период интенсивного фетогенеза / Я. Р. Мацюк, О. В. Барабан // Новости мед.-биол. наук. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 151–156.
16. Calmus, Y. Ursodeoxycholic acid (UDCA) in the treatment of chronic cholestatic diseases / Y. Calmus, R. Pouchon // Biochimie. – 1991. – Vol. 73. – P. 1335–1338.