

УДК 616-092.12:612.6

3.3.3 Патологическая физиология

DOI: 10.37903/vsgma.2021.3.2

**АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В ЦИТОПЛАЗМЕ ГЕПАТОЦИТОВ ПЛОДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ САМОК БЕЛЫХ КРЫС, С ИЗМЕНЁННЫМ Т-КЛЕТОЧНЫМ ИММУНИТЕТОМ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ**

© Лис Р.Е., Аладьева Т.Л., Шимчук Е.И.

*Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Беларусь Гродно, ул. Горького, 80**Резюме*

**Цель.** Определить возможные изменения метаболизма гепатоцитов плодов белых крыс при раздельном действии конканавалина А и циклофосфамида и сочетанного действия конканавалина А и циклофосфамида при введении их самкам белых крыс во время беременности до и после имплантации.

**Методика.** Исследование проведено на 43 беременных самках белых крыс и полученных от них плодах. Конканавалина А и циклофосфамид вводились беременным самкам белых крыс как раздельно, так и сочетано в первую или во вторую половину беременности. На 20-й день беременности определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАДН<sub>2</sub>-дегидрогеназы (НАДН<sub>2</sub>ДГ) и НАДФН<sub>2</sub>-дегидрогеназы (НАДФН<sub>2</sub>ДГ) в цитоплазме гепатоцитов плодов, полученных от подопытных самок.

**Результаты.** Сочетанное действие конканавалина А и циклофосфамида до и после имплантации не приводит к достоверному изменению уровней активности исследуемых ферментов. При раздельном введении препаратов уровень активности ЛДГ достоверно повышен при введении циклофосфамида на 5-й день беременности и конканавалина А на 13-й день беременности; уровень активности НАДФН<sub>2</sub>ДГ достоверно понижен при введении конканавалина А на 13-й день беременности и циклофосфамида на 15-й день беременности. Уровни активности СДГ и НАДН<sub>2</sub>ДГ изменяются недостоверно независимо от сроков и вида воздействия.

**Заключение.** Моделирование Т-клеточного иммунодефицита во время беременности у матери не приводит к достоверному изменению уровней активности СДГ, ЛДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ в цитоплазме гепатоцитов плода.

*Ключевые слова:* конканавалин А, циклофосфамид, крысы, антенатальное развитие, гепатоциты плода, СДГ, ЛДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ

**ACTIVITY OF ENZYMES IN THE CYTOPLASM OF HEPATOCYTES OF FETUSES OBTAINED FROM FEMALE WHITE RATS WITH ALTERED T-CELL IMMUNITY DURING PREGNANCY**

Lis R.E., Aladyeva T.L. Shimchuk E.I.

*Grodno State Medical University, 80, Gorky St., 230009, Grodno, Belarus**Abstract*

**Objective.** To determine possible changes in the metabolism of hepatocytes of white rat fetuses under the separate action of concanavalin A and cyclophosphamide and the combined action of concanavalin A and cyclophosphamide when administered to female white rats during pregnancy before and after implantation.

**Methods.** The study was conducted on 43 pregnant female white rats and their fetuses. Concanavalin A and cyclophosphamide were administered to pregnant female white rats either separately or in combination during the first or second half of pregnancy. On the 20th day of pregnancy, the activity of succinate dehydrogenase (SDH), lactate dehydrogenase (LDH), NADH<sub>2</sub> dehydrogenase (NADH<sub>2</sub>DH) and NADPH<sub>2</sub> dehydrogenase (NADPH<sub>2</sub>DH) in the cytoplasm of hepatocytes of fetuses obtained from experimental females was determined.

**Results.** The combined action of concanavalin A and cyclophosphamide before and after implantation does not lead to a significant change in the activity levels of the studied enzymes. With separate administration of drugs, the level of LDH activity was significantly increased with the introduction of cyclophosphamide on the 5th day of pregnancy and concanavalin A on the 13th day of pregnancy; the

level of NADPH<sub>2</sub>DH activity was significantly reduced with the introduction of concanavalin A on the 13th day of pregnancy and cyclophosphamide on the 15th day of pregnancy. The activity levels of SDH and NADH<sub>2</sub>DH vary unreliably regardless of the duration and type of exposure.

**Conclusion.** Modeling of T-cell immunodeficiency during pregnancy in the mother does not lead to a significant change in the levels of activity of SDH, LDH, NADH<sub>2</sub>DH and NADPH<sub>2</sub>DH in the cytoplasm of fetal hepatocytes.

*Keywords:* concanavalin A, cyclophosphamide, rats, antenatal development, fetal hepatocytes, SDH, LDH, NADH<sub>2</sub>DH and NADPH<sub>2</sub>DH

## Введение

Развитие зародыша и плода регулируется совокупностью факторов: алиментарных, гормональных, генетических, экологических. Также важную роль в развитии органов и систем органов играют интегрирующие системы – нервная, иммунная, эндокринная. Изменения функционирования этих систем во время беременности создают риск нарушений развития как отдельных органов, так и организма в целом. Особенно это относится к иммунной системе. Известно, что развивающийся зародыш и плод является генетически чуждым для организма матери. Обычно генетически чуждый материал отторгается за счет иммунологических реакций в течение примерно двух недель, но плод естественным образом продолжает оставаться привилегированным участком, не подлежащим отторжению, хотя эмбриональные и материнские клетки взаимодействуют на протяжении всей беременности. Поэтому нормально протекающая беременность выглядит парадоксально.

По литературным данным во многих случаях изменение гомеостаза материнской иммунной системы во время беременности приводит к нарушениям в развитии плода [4, 12, 14, 15]. Согласно нашим исследованиям, модификация иммунной системы матери во время беременности (до и после имплантации) с помощью конканавалина А (Кон А) и циклофосфамида (ЦФ) приводит к разным последствиям для зародыша и плода в виде гибели зародыша до имплантации и нарушении формирования костного скелета у плодов [5].

Целью исследования явилось определение возможных изменений метаболизма гепатоцитов плодов белых крыс при раздельном действии КонА и ЦФ и сочетанного действия Кон А и ЦФ при введении их самкам белых крыс во время беременности до и после имплантации.

## Методика

В эксперименте было использовано 43 беременных самки белых крыс и плоды от них. Масса самок составляла 200-250 г. Животные подопытных и интактной групп содержались в стандартных условиях вивария. Для моделирования Т-клеточного иммунодефицита беременным самкам белых крыс вводился Кон А в дозе 100 мкг/кг и через двое суток ЦФ в дозе 10 мг/кг. Кон А вызывает неспецифическую пролиферацию Т-лимфоцитов, а ЦФ, как цитостатик, останавливает пролиферативные процессы, вызывая угнетение Т-клеточного иммунитета [2, 3, 10].

В первую половину беременности раздельное введение препаратов животным подопытных групп осуществлялось следующим образом: Кон А вводился на 3-й день беременности (ДБ), а ЦФ - на 5-й ДБ (Первым днём беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке). При сочетанном воздействии эти препараты вводились животным одной и той же подопытной группы по вышеприведённой схеме: Кон А вводился на 3-й ДБ, а ЦФ – на 5-й ДБ.

Во вторую половину беременности раздельное введение препаратов животным подопытных групп осуществлялось следующим образом: Кон А вводился на 13-й ДБ, а ЦФ – на 15-й ДБ. При сочетанном воздействии эти препараты вводились животным одной той же подопытной группы по вышеприведённой схеме: Кон А вводился на 13-й ДБ, а ЦФ – на 15-й ДБ.

Так как предварительные исследования показали, что введение физиологического раствора (изотонического раствора NaCl) не изменяет уровня исследуемых показателей, контролем служили интактные животные. Интактные животные не подвергались никаким воздействиям.

Для определения влияния Кон А, ЦФ и сочетанного действия Кон А и ЦФ на метаболизм гепатоцитов плодов беременных самок подопытных и интактной групп декапитировали на 20-й день беременности под эфирным наркозом и выделяли плоды. У одного плода из помёта выделяли

печень и замораживали в жидком азоте. Из замороженных кусочков печени готовили криостатные срезы толщиной 10 мкм в микротоме-криостате Microm HM 525 при температуре  $-25^{\circ}\text{C}$ . На криостатных срезах проводили гистохимические реакции по выявлению активности СДГ, ЛДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ, НАДФН<sub>2</sub>ДГ [6]. Все гистохимические исследования сопровождались безсубстратными контролями.

Уровень активности ферментов учитывался с помощью компьютерной системы анализа изображений BIOSCAN-NT по коэффициенту пропускания окрашенного среза в единицах оптической плотности. Полученные цифровые данные от каждого животного анализировали методами непараметрической статистики посредством программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США) в связи с небольшими объемами выборок. В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me), границы процентилей (от 25 до 75). Количественные результаты представлены в виде Me – медиана, LQ – верхняя граница нижнего квартиля; UQ – нижняя граница верхнего квартиля. Достоверными считали различия между контрольной и опытной группами при значениях  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test).

### Результаты исследования и их обсуждение

Уровень активности СДГ в гепатоцитах печени плодов находится на низком уровне как у подопытных, так и интактных животных. Изменение уровня активности СДГ у подопытных животных относительно интактных показателей незначительны и недостоверны (табл. 1).

Таблица 1. Уровень активности СДГ в цитоплазме гепатоцитов (в ед. опт. плотности  $\times 1000$ ) плодов на 20-й день антенатального развития подопытных и контрольных животных при введении Кон А и ЦФ до и после имплантации (Me ( $Q_1 \div Q_2$ ))

Воздействие	Медиана	% к интактным	25% перцентиль	75% перцентиль
Кон А 3 ДБ	50	83,3	50	70
ЦФ 5 ДБ	60	100	50	60
Кон А 3 ДБ+ЦФ 5ДБ	70	116,6	60	90
Кон А 13 ДБ	70	116,6	50	70
ЦФ 15 ДБ	60	100	50	80
Кон А 13 ДБ+ЦФ 15ДБ	65	108,3	60	70
Интактные	60		55	70

Уровень активности ЛДГ в гепатоцитах печени плодов статистически достоверно повышен по сравнению с интактными животными при введении ЦФ на 5-й ДБ и Кон А на 13-й ДБ на 28 и 36% соответственно (табл. 2). В остальных подопытных группах статистически достоверные различия с интактными показателями отсутствуют, хотя и наблюдается в основном тенденция к повышению активности данного фермента в ответ на воздействие.

Таблица 2. Уровень активности ЛДГ в цитоплазме гепатоцитов (в ед. опт. плотности  $\times 1000$ ) плодов на 20-й день антенатального развития подопытных и контрольных животных при введении Кон А и ЦФ до и после имплантации (Me ( $Q_1 \div Q_2$ ))

Воздействие	Медиана	% к интактным	25% перцентиль	75% перцентиль
Кон А 3 ДБ	150	120	140	160
ЦФ 5 ДБ	160*	128	150	160
Кон А 3 ДБ+ЦФ 5ДБ	100	80	80	130
Кон А 13 ДБ	170*	136	140	180
ЦФ 15 ДБ	130	104	130	140
Кон А 13 ДБ+ЦФ 15ДБ	155	124	145	165
Интактные	125	-	110	145

Примечание: \* – статистически достоверные различия с интактными показателями при  $p < 0,05$

Уровень активности НАДН<sub>2</sub>ДГ у подопытных животных статистически достоверно от интактных показателей не отличается, хотя и наблюдаются повышение уровня активности при введении Кон А на 3-й ДБ – на 20,75%; при введении Кон А на 13-й ДБ – на 24,53%; и снижение уровня активности при введении ЦФ на 15-й ДБ на 24,53% (табл. 3).

Таблица 3. Уровень активности НАДН<sub>2</sub>ДГ в цитоплазме гепатоцитов (в ед. опт. плотности ×1000) плодов на 20-й день антенатального развития подопытных и контрольных животных при введении Кон А и ЦФ до и после имплантации (Ме (Q<sub>1</sub> ÷ Q<sub>2</sub>))

Воздействие	Медиана	% к интактным	25% перцентиль	75% перцентиль
Кон А 3 ДБ	320	120,75	300	390
ЦФ 5 ДБ	260	98,11	240	340
Кон А 3 ДБ+ЦФ 5ДБ	260	98,11	250	280
Кон А 13 ДБ	330	124,53	280	350
ЦФ 15 ДБ	200	75,47	180	210
Кон А 13 ДБ+ЦФ 15ДБ	300	113,21	280	350
Интактные	265		250	290

Активность НАДФН<sub>2</sub>ДГ также, как и активности других исследуемых ферментов, изменяется неоднозначно в зависимости от срока и вида воздействия. При введении ЦФ на 5-й ДБ уровень активности НАДФН<sub>2</sub>ДГ повышен 30,77%, но недостоверно. При раздельном введении Кон А на 13-й ДБ и ЦФ на 15-й ДБ уровень активности понижен на 53,75% в обоих случаях, при достоверном различии с интактными показателями (табл. 4).

Таблица 4. Уровень активности НАДФН<sub>2</sub>ДГ в цитоплазме гепатоцитов (в ед. опт. плотности ×1000) плодов на 20-й день антенатального развития подопытных и контрольных животных при введении Кон А и ЦФ до и после имплантации (Ме (Q<sub>1</sub> ÷ Q<sub>2</sub>))

Воздействие	Медиана	% к интактным	25% перцентиль	75% перцентиль
Кон А 3 ДБ	120	92,31	100	180
ЦФ 5 ДБ	170	130,77	120	200
Кон А 3 ДБ+ЦФ 5ДБ	140	107,69	100	160
Кон А 13 ДБ	60*	46,15	50	70
ЦФ 15 ДБ	60*	46,15	60	70
Кон А 13 ДБ+ЦФ 15ДБ	135	103,85	115	155
Интактные	130	-	80	130

Примечание: \* – статистически достоверные различия с интактными показателями при p<0,05

При исследовании метаболизма печени плода явной зависимости изменения уровней активности исследуемых ферментов от функционального состояния иммунной системы матери не наблюдается, так как нет зависимости между сочетанным действием ЦФ и Кон А и достоверным изменением уровня активности исследуемых ферментов. Однако, раздельное воздействие Кон А и ЦФ приводит к достоверным изменениям уровней активности ЛДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ, но не СДГ и НАДН<sub>2</sub>ДГ.

СДГ и НАДН<sub>2</sub>ДГ являются маркерными ферментами аэробных процессов [1], а аэробные процессы у плода не протекают интенсивно, что связано с перераспределением энергетического метаболизма в пренатальный период, так как плацентарное кровообращение, функционирующее во внутриутробном периоде, характеризуется относительно невысоким поступлением кислорода в организм плода. Вследствие этого в тканях развивающегося эмбриона и плода достаточно активно протекает анаэробный гликолиз [7]. Так как у плода не задействован в полной мере аэробный энергетический метаболизм, то внешнее воздействие не приводит к его значительным нарушениям. Напряженность анаэробного гликолиза, напротив, высока в связи с дефицитом кислорода у плода, поэтому повышение уровня активности ЛДГ может являться компенсаторным ответом на внешнее воздействие как в случае раздельного введения ЦФ на 5-й ДБ и Кон А на 13-й ДБ.

У зародышей крысы печень начинает закладываться в конце 10-х суток внутриутробного развития в виде «печёночного поля» – утолщения энтодермы кишечной трубки. На 14-е сутки эмбриогенеза увеличившаяся клеточная масса «печёночного поля» формирует печеночный дивертикул [8, 9]. Раздельное введение Кон А на 13-й ДБ и ЦФ на 15-й ДБ осуществлялось во время критического периода закладки печени. Известно, что Кон А и ЦФ активируют процессы выработки активных форм кислорода (АФК) [11, 13], для защиты от повреждающего действия которых, в организме используются антиоксиданты (глутатион аскорбиновая кислота, витамин Е). Для восстановления активности антиоксидантов используется НАДФН<sub>2</sub>. По уровню активности НАДФН<sub>2</sub>ДГ можно судить о выработке НАДФН<sub>2</sub>. Следовательно, провокация выработки АФК в критический период

закладки печени могла привести к срыву антиоксидантной защиты гепатоцитов, что видно по низкому уровню активности НАДФН<sub>2</sub>ДГ в гепатоцитах плодов на 20-й ДБ.

## Заключение

Моделирование Т-клеточного иммунодефицита у беременных крыс путём сочетанного действия Кон А и ЦФ, не приводит к достоверным изменениям уровней активности СДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ, ЛДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ в цитоплазме гепатоцитов их плодов на 20-й ДБ. Раздельное введение Кон А и ЦФ вызывает достоверные изменения уровней активности только у ЛДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ при введении Кон А на 13-й ДБ и ЦФ на 5-й ДБ и 15-й ДБ.

## Литература (references)

1. Ковальский Г.Б. Введение в количественную гистохимию ферментов / под ред. Т.В. Журавлевой, Р.А. Прочуханова. – М.: Медицина, 1978. – С. 58-114. [Koval'skij, G.B. *Vvedenie v kolichestvennuju gistohimiju fermentov*. Introduction to quantitative histochemistry of enzymes / pod red. T.V. Zhuravlevoj, R.A. Prochuhanova. – Moscow: Medicina, 1978. – P. 58-114. (in Russian)]
2. Кондратьева Т.К., Михеева Н.В., Фонталин Л.Н. Природа иммунодефицита, индуцированного инъекциями лектинов и циклофосфамида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1988. – №8. – С. 195-198. [Kondrat'eva T.K., Miheeva N.V., Fontalin L.N. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 1988. – N8. – P. 195-198. (in Russian)]
3. Леонтьева Т.И., Гладкова Н.Е., Утешев Б.С. Исследование иммунотропной активности циклофосфана // Фармакология и токсикология – 1988. – Т.51, №6. – С. 60-65. [Leont'eva T.I., Gladkova N.E., Uteshev B.S. *Farmakologija i toksikologija*. Pharmacology and Toxicology. – 1988. – V.51, N6. – P. 60-65. (in Russian)]
4. Лис Р.Е., Бандажевский Ю.И. Влияние бактериального липополисахарида продигозана на антенатальный нейрогенез коры больших полушарий плодов белых крыс // Известия Академии Наук БССР. Серия биологических наук. – 1986. – №4. – С. 76-79. [Lis R.E., Bandazhevskij Ju.I. *Izvestija Akademii Nauk BSSR. Serija biologicheskikh nauk*. News of the Academy of Sciences of the BSSR. A series of biological sciences. – 1986. – N4. – P. 76-79. (in Russian)]
5. Лис Р.Е., Аладьева Т.Л. Оценка влияния изменения Т-клеточного иммунитета белых крыс во время беременности на развитие плодов // Оренбургский медицинский вестник. Т.VII, №3(27). – С. 40-46. [Lis R.E., Alad'eva T.L. *Orenburgskij medicinskij vestnik*. Orenburg medical bulletin. – V.VII, N3(27). – P. 40-46. (in Russian)]
6. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. – М.: Мир. – 1982. – 272 с. [Lojda Z., Gossrau R., Shibler T. *Gistohimija fermentov. Laboratornye metody*. Histochemistry of enzymes. Laboratory methods. – Moscow: Mir. – 1982. – 272 p. (in Russian)]
7. Масловская А.А. Особенности энергетического обмена у детей // Журнал ГрГМУ. – 2006. – №1. – С. 25-28. [Maslovskaja A.A., *Zhurnal GrGMU*. GrSMU Magazine. – 2006. – N1. – P. 25-28. (in Russian)]
8. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы (Лабораторные животные). – СПб: Лань. – 2001. – 464 с. [Nozdrachev A.D., Poljakov E.L. *Anatomija krysy (Laboratornye zhivotnye)*. Rat Anatomy (Laboratory animals). – Saint-Petersburg: Lan'. – 2001. – 464 p. (in Russian)]
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. – 2010. – 358 с. [*Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomedicinskih tehnologijah*. Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technologies / pod red. N.N. Karkishhenko, S.V. Gracheva. – Moscow: Profil-2S. – 2010. – 358 p. (in Russian)]
10. Фонталин Л.Н., Кондратьева Т.К., Михеева Н.В. Т-клеточный иммунодефицит у мышей, получивших лектин и циклофосфамид // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1988. – №7. – С. 75-78. [Fontalin L.N., Kondrat'eva T.K., Miheeva N.V. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 1988. – N7. – P. 75-78. (in Russian)]
11. Ghobadi E., Moloudizargari M., Asghar M.H., Abdollahi M. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2017. – V.13, N5. – P. 525-536.
12. Robbins J., Bakardjiev A. Pathogens and the placental fortress // *Current Opinion in Microbiology*. – 2012. – V.15, N1. – P. 36-43.
13. Schwabe R.F., Brenner D.A. Mechanisms of Liver Injury // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2006. – V.290. – P. 583-589.

14. Soumiya H., Fukumitsu H., Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex // Journal of Neuroscience Research. – 2011. – V.89, N10. – P. 1575-1585.
15. Tang A., Quenby S. Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. – 2010. – V.22, N6. – P. 446-451.

#### **Информация об авторах**

*Лис Руслан Евгеньевич* – кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Беларуси. E-mail: r.lis@mail.ru

*Аладьева Татьяна Леонидовна* – ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Беларуси. E-mail: aladyevatl@mail.ru

*Шимчук Елизавета Игоревна* – студентка лечебного факультета УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Беларуси. E-mail: shimchuk.lisa@mail.ru

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.