

УДК 616.366-008.811.4-018:577.218:615.244]-074

О.Є. Абатуров, І.В. Твердохліб, В.Л. Бабич, О.О. Русякова

## Вплив холеретичної терапії на активність експресії мікроРНК-378f та м'язову оболонку стінки жовчного міхура

Дніпровський державний медичний університет, Україна

Modern Pediatrics. Ukraine. (2022). 5(125): 26-34. doi 10.15574/SP.2022.125.26

**For citation:** Abaturon OE, Tverdokhlib IV, Babysh VL, Rusakova OO. (2022). The effect of choleretic therapy on the expression activity of microRNA-378f and the muscular layer of the gallbladder wall. Modern Pediatrics. Ukraine. 5(125): 26-34. doi 10.15574/SP.2022.125.26.

Функціональні розлади жовчного міхура та сфінктера Одді в дітей залишаються актуальними через значний їх відсоток у структурі хвороб біліарної системи. Одним із варіантів холеретичної терапії є застосування урсодезоксихолевої кислоти.

**Мета** — вивчити ефективність холеретичної терапії, зокрема урсодезоксихолевої кислоти, у дітей з функціональними розладами жовчного міхура та сфінктера Одді на підставі визначення активності генерації мікроРНК-378f та впливу на клітини м'язової оболонки стінки жовчного міхура.

**Матеріали та методи.** Обстежено 70 дітей з функціональними розладами жовчного міхура та сфінктера Одді. Рівень експресії мікроРНК-378f у сироватці крові визначали методом полімеразної ланцюгової реакції. Експериментальну частину дослідження проведено на 30 мишах. Ультраструктурний аналіз здійснено за стандартною схемою за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа.

**Результати.** Спостерігалися позитивна динаміка скоротливості жовчного міхура та достовірне підвищення рівня експресії мікроРНК-378f у сироватці крові в дітей з функціональними розладами жовчного міхура та сфінктера Одді після курсу терапії урсодезоксихолевою кислотою ( $p < 0,05$ ). Після впливу урсодезоксихолевої кислоти гістологічно визначалися мітотичні індекси лейоміоцитів стінки дна і тіла жовчного міхура достовірно вищі за показники інтактних мишей ( $p < 0,01$ ); значуще зростання ядерної активності фібробластів за рахунок деконденсації хроматину та збільшення кількості ядерних пор ( $p < 0,01$ ); суттєве достовірне збільшення кількості інтерстиційних клітин Кахалю в м'язовій оболонці жовчного міхура мишей ( $p < 0,01$ ).

**Висновки.** У дітей з функціональними розладами жовчного міхура та сфінктера Одді на тлі холеретичної терапії під впливом урсодезоксихолевої кислоти спостерігається підвищення зниженої скоротливості жовчного міхура та рівня експресії мікроРНК-378f у сироватці крові. Урсодезоксихолева кислота викликає гіперплазію лейоміоцитів та їх внутрішньоклітинні ультраструктурні зміни, зростання ядерної активності фібробластів і збільшення кількості інтерстиційних клітин Кахалю м'язової оболонки стінки жовчного міхура в експериментальних тварин. Дані морфологічні зміни, вірогідно, обумовлюють підвищення скоротливої функції жовчного міхура. Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної в роботі установи. На проведення досліджень отримано інформовану згоду батьків дітей. Утримання експериментальних тварин здійснено відповідно до санітарно-гігієнічних норм віварію зазначеної установи та проведено з дозволу комісії з питань біомедичної етики.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Ключові слова:** діти, жовчний міхур, сфінктер Одді, функціональні розлади, мікроРНК-378f, холеретична терапія, урсодезоксихолева кислота.

### The effect of choleretic therapy on the expression activity of microRNA-378f and the muscular layer of the gallbladder wall

O.E. Abaturon, I.V. Tverdokhlib, V.L. Babysh, O.O. Rusakova

Dnipro State Medical University, Ukraine

Functional disorders of the gallbladder and sphincter of Oddi in children remain relevant due to their significant percentage in the structure of diseases of the biliary system. One of the options for choleretic therapy is the use of ursodeoxycholic acid.

**Purpose** — to study the effectiveness of choleretic therapy, namely ursodeoxycholic acid, in children with functional disorders of the gallbladder and sphincter of Oddi by determining the activity of microRNA-378f generation and the impact on the cells of the muscular layer of the gallbladder wall.

**Materials and methods.** A comprehensive examination of 70 children with functional disorders of the gallbladder and sphincter of Oddi. To determine the level of expression of microRNA-378f in the serum used the method of real-time polymerase chain reaction. The experimental part of the study was performed on 30 mice. Ultrastructural analysis was performed according to a standard scheme using a transmission electron microscope.

**Results.** Positive dynamics of gallbladder contractility and significant increase in the expression of microRNA-378f in the serum was observed in children with functional disorders of the gallbladder and sphincter of Oddi after a course of ursodeoxycholic acid therapy ( $p < 0,05$ ). After exposure to ursodeoxycholic acid, the mitotic indices of leiomyocytes of the bottom wall and body of the gallbladder were significantly histologically determined compared to intact mice ( $p < 0,01$ ); there was a probable increase in the nuclear activity of fibroblasts due to decondensation of chromatin and an increase in the number of nuclear pores ( $p < 0,01$ ); significant increase in the number of Kahal interstitial cells in the muscular layer of the gallbladder of mice was observed ( $p < 0,01$ ).

**Conclusions.** In children with functional disorders of the gallbladder and sphincter of Oddi during choleretic therapy under the influence of ursodeoxycholic acid there is an increase in decreased contractility of the gallbladder and the level of expression of microRNA-378f in serum. The use of ursodeoxycholic acid causes leiomyocyte hyperplasia and their intracellular ultrastructural changes, increased fibroblast nuclear activity, and an increase in the number of interstitial Kahal interstitial cells of the gallbladder muscle in experimental animals. These morphological changes are likely to increase the contractile function of the gallbladder.

The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the institution mentioned in the work. Informed consent of the children's parents was obtained for the research. The maintenance of experimental animals was carried out in accordance with the sanitary and hygienic norms of the vivarium of the specified institution and was carried out with the permission of the commission on biomedical ethics.

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** children, gallbladder, sphincter of Oddi, functional disorders, micro-RNA-378f, choleretic therapy, ursodeoxycholic acid.

## Вступ

Діагностика та лікування функціональних розладів жовчного міхура та сфінктера Одді (ФР ЖМ та СФО) залишаються актуальними через значний відсоток (65,0–85,0%) цих розладів у структурі хвороб біліарної системи в дітей та високий рівень поширеності [18,29]. Загальновідомо, що хвороби біліарного тракту (БТ) є найбільш поширеними й тяжкими серед дитячої гастроентерологічної патології [20,26], яка на сучасному етапі посідає одне з провідних місць у загальній захворюваності дітей в Україні [19]. Клінічні прояви функціональних розладів БТ погіршують якість життя дітей [12,25,29].

На сьогодні науковцями визначені деякі генетичні та анамнестичні фактори, що призводять до порушення роботи сфінктерного апарату та моторики ЖМ із проявами холестази і гепатоцитолізу [9]. Однак із розвитком сучасної науки особливого інтересу набуває вивчення механізмів епігенетичного впливу на формування функціональних розладів біліарної системи в дітей [16]. МікроРНК (microRNA, miRNA, miR) — це малі некодуючі молекули РНК довжиною 21–23 нуклеотиди, які регулюють експресію генів на посттранскрипційному рівні шляхом РНК-інтерференції. МікроРНК опосередковано беруть участь у синтезі білків, диференціюванні клітин і тканин [2,4]. За результатами всебічного огляду з використанням новітніх інформаційних пошукових баз даних встановлено, що в сучасній науковій літературі автори визначають лише асоціацію активності генерації мікроРНК і розвиток органічних захворювань біліарної системи [17,31]. Тому особливої актуальності набуває встановлення активності генерації мікроРНК ФР ЖМ та СФО в дітей для подальшої обґрунтованої медикаментозної корекції цих станів.

На цей час залишаються остаточно не вирішеними та дискусійними деякі питання холеретичної терапії функціональних розладів БТ в дітей [1,20]. Одним із варіантів холеретичної терапії є застосування урсодезоксихолевої кислоти (УДХК), яка має виражений позитивний терапевтичний ефект при різних захворюваннях біліарної системи [5,8]. За останні два десятиліття вчені вивчають ефективність впливу УДХК на активність генерації деяких мікроРНК при різних органічних захворюваннях

біліарної системи [3,13]. Встановлення зміни спектра експресії певних мікроРНК при ФР ЖМ та СФО в дітей може мати цінну діагностичну значущість, а дослідження медикаментозного управління активністю продукції деяких мікроРНК за допомогою УДХК являє собою новітній напрям терапії захворювань БТ.

**Мета** дослідження — вивчити ефективність холеретичної терапії, зокрема УДХК, у дітей з ФР ЖМ та СФО на підставі визначення активності генерації мікроРНК-378f та впливу на клітини м'язової оболонки стінки ЖМ.

## Матеріали та методи дослідження

Проведено комплексне обстеження 70 дітей з ФР ЖМ та СФО віком від 4 до 14 років на базі КЗ «Дніпровська міська клінічна лікарня № 1» ДМР» м. Дніпро. Для встановлення діагнозу керувалися положеннями наказу Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України від 29.01.2013 № 59 «Про затвердження уніфікованих клінічних протоколів медичної допомоги дітям із захворюваннями органів травлення» [18] та клінічними критеріями ФР ЖМ та СФО за Римською класифікацією функціональних розладів травлення IV (2016) [7] на підставі результатів клініко-анамнестичних, загальноклінічних, біохімічних, інструментальних методів дослідження.

Дизайн дослідження обрано відкритим, моноцентровим, когортно-проспективним, рандомізованим. Дослідження виконано клінічно, контрольовано в паралельних групах. Наукове дослідження проведено за наявності інформованої згоди батьків або опікунів пацієнтів і практично здорових дітей згідно із сучасними науковими стандартами, передбачено заходи щодо забезпечення здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до Гельсінської декларації, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Загальної декларації про біоетику та права людини ЮНЕСКО, відповідних законодавчих актів України (Конституції України (ст. 3, 21, 24, 28, 32), Основ законодавства України про охорону здоров'я (ст. 43.1, 44.1), Закону України «Про лікарські засоби» (ст. 7, 8).

Пацієнтів із ФР ЖМ та СФО поділено на дві групи методом простої рандомізації. Основна група представлена 50 пацієнта-

ми, які отримували терапію з УДХК згідно з положеннями наказу МОЗ України від 29.01.2013 № 59, яку призначали з розрахунку 10–15 мг/кг/добу 2 рази на добу. До групи порівняння увійшло 20 пацієнтів, які отримували терапію без УДХК (екстракт листя артишоку у віковому дозуванні). Курс лікування в обох групах становив 4 тижні. Після завершення курсу комплексної терапії в поєднанні з УДХК або без неї на основі динаміки скарг, об'єктивних даних, результатів біохімічних, інструментальних методів дослідження оцінено ефективність лікування. Вірогідних відмінностей за гендерно-віковими показниками в групах обстежених дітей не виявлено.

Молекулярно-генетичне дослідження проведено з визначенням рівня експресії мікроРНК-378f у сироватці крові до початку лікування й після закінчення терапії в дітей основної групи та групи порівняння всім дітям із ФР ЖМ та СФО. Застосовано метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі зі зворотною транскрипцією згідно з протоколом TaqMan Gene Expression Assays. Дослідження проведено у відділі загальної і молекулярної патології Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, м. Київ (директор — д.мед.н., академік, професор О.О. Кришталь; завідувач відділу — д.мед.н., професор В.Є. Досенко).

Експериментальну частину дослідження проведено на 30 мишах лінії BALB/c, які пройшли попередню акліматизацію впродовж 14 діб та були оглянуті кваліфікованим ветеринаром за 1 добу до початку дослідження. Утримання експериментальних тварин здійснено відповідно до санітарно-гігієнічних норм віварію ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (ДЗ «ДМА МОЗ України») та проведено з дозволу комісії з питань біомедичної етики ДЗ «ДМА МОЗ України». Дослідження виконано відповідно до законодавства України з дотриманням відповідних правил ICH/GLP (Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження»), правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [10,28].

Експериментальних тварин методом простої рандомізації поділено на 2 групи: експериментальну (n=17) — тварини, які отримували УДХК в дозі 100,0 мг/кг; та контрольну

(n=13) — інтактні (дистильована вода). Досліджуваний препарат, а також дистильовану воду вводили внутрішньошлунково 1 раз на добу протягом 30 діб. На 31-шу добу мишей виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації.

Для морфологічних досліджень у тварин виділено ЖМ, який у подальшому фіксували, виготовляли зрізи тканини завтовшки 3–5 мкм та фарбували гематоксиліном і еозином. Використано загальноприйняті стандарти гістологічних процедур [21]. Зображення отримано на мікроскопі «Axioskop» («Zeiss», Німеччина), за допомогою 8-бітної CCD-камери «СОНУ-4922» («СОНУ Inc.», США) їх введено в комп'ютерну систему аналізу зображень «VIDAS-386» («Kontron Elektronik», Німеччина). Морфометричний аналіз здійснено в автоматичному режимі за допомогою програми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування «VIDAS-2.5» («Kontron Elektronik», Німеччина). Для ультраструктурного аналізу зразки ЖМ мишей фіксовано та забарвлено за стандартною методикою. Для електронномікроскопічного дослідження ультратонкі зрізи виготовлено на ультрамікроскопі «УМТП-6М». Електронномікроскопічне дослідження виконано за стандартною схемою за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (ТЕМ) «ПЕМ-100-01» [24].

Статистичний аналіз отриманих результатів проведено з використанням пакету прикладних програм «STATISTICA 6.1» (№ AGAR909E415822FA) за допомогою персонального комп'ютера на базі процесора «Intel Pentium 4». Параметричні та непараметричні методи статистики застосовувалися залежно від результату перевірки. При нормальному розподілі значень параметрів кількісні показники наведено у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього ( $M \pm m$ ). Для якісних ознак розраховано відносні величини (%). Для порівняння середніх показників у всіх групах використано t-критерій Стьюдента. Відмінності між ознаками, що порівнювалися, для всіх видів аналізу прийнято статистично значущими при  $p < 0,05$  [22].

## Результати дослідження та їх обговорення

### Динаміка клінічних і параклінічних проявів функціональних розладів жовчного міхура та сфінктера Одді в дітей

Аналіз отриманих даних показав, що використання УДХК у холеретичній терапії

ФР ЖМ та СФО призводить до позитивної клінічної динаміки в стані дитини. Так, після терапії в дітей з ФР ЖМ та СФО основної групи спостерігалось повне зникнення або статистично значуще зменшення ознак болювого абдомінального синдрому, повну відсутність диспептичних проявів і вірогідне зменшення симптомів астено-вегетативного синдрому. На противагу цим результатам, у пацієнтів групи порівняння зберігалися ознаки вищевказаних клінічних синдромів ФР ЖМ та СФО.

Щодо динаміки результатів дослідження біохімічних маркерів холестазу та гепатоцитолізу на тлі проведеної терапії, то в дітей основної групи, яким призначали УДХК, відмічалось достовірне зниження середніх значень вмісту аспартатамінотрансферази — АСТ ( $26,2 \pm 1,0$  н/л проти  $35,0 \pm 1,3$  н/л до лікування,  $p < 0,05$ ), аланінамінотрансферази — АЛТ ( $15,0 \pm 0,6$  н/л проти  $18,8 \pm 0,9$  н/л до лікування,  $p < 0,05$ ) та лужної фосфатази ( $359,5 \pm 16,6$  н/л проти  $507,9 \pm 19,9$  н/л до лікування,  $p < 0,05$ ) у сироватці крові. Аналогічні середні значення спостерігалися в пацієнтів групи порівняння, які не отримували УДХК, не мали вірогідних змін — АсАТ ( $29,7 \pm 1,7$  н/л проти  $28,2 \pm 1,3$  н/л до лікування,  $p > 0,05$ ), АлАТ ( $15,9 \pm 1,2$  н/л проти  $17,4 \pm 1,5$  н/л до лікування,  $p > 0,05$ ), лужна фосфатаза ( $499,5 \pm 40,2$  н/л проти  $542,9 \pm 41,0$  н/л до лікування,  $p > 0,05$ ).

За результатами дослідження, спостерігалась позитивна динаміка скоротливості ЖМ у дітей з ФР ЖМ та СФО після курсу терапії УДХК ( $45,6 \pm 1,7\%$  проти  $23,4 \pm 1,6\%$  до лікування,  $p < 0,05$ ). У дітей, які не отримували УДХК, скорочувальна функція ЖМ залишалась зниженою ( $29,7 \pm 3,0\%$  проти  $23,8 \pm 2,3\%$  до лікування,  $p > 0,05$ ).

**Динаміка експресії мікроРНК-378f у сироватці крові при функціональних розладах жовчного міхура та сфінктера Одді в дітей**

Після курсу терапії з УДХК позитивна клінічна динаміка в обстежених дітей основної групи супроводжувалась достовірним підвищенням рівня експресії мікроРНК-378f ( $5,2 \pm 0,7$  УО проти  $2,0 \pm 0,6$  УО до лікування,  $p < 0,05$ ), що може бути пов'язано з відновленням дренажу жовчі на тлі застосування УДХК. У дітей групи порівняння при терапії без УДХК змін рівня експресії мікроРНК-378f не спостерігалось ( $4,5 \pm 0,8$  УО проти  $2,1 \pm 1,0$  УО до лікування,  $p > 0,05$ ).

За результатами дослідження, УДХК у дітей з ФР ЖМ та СФО чинила позитив-

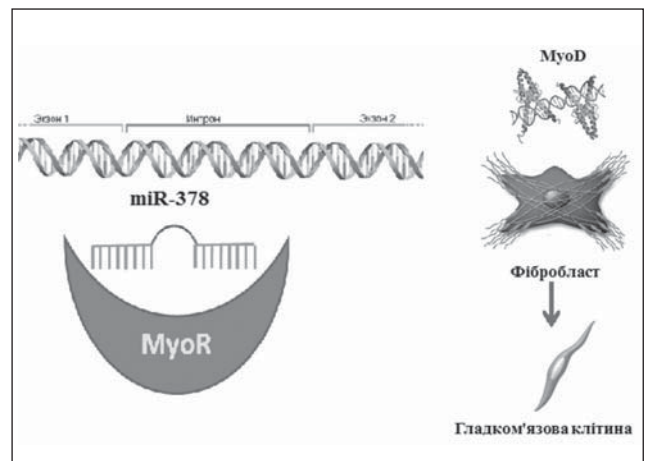
ний вплив на скорочувальну функцію ЖМ і сприяла підвищенню рівня експресії мікроРНК-378f у сироватці крові.

**Механізм диференціації фібробластів у гладком'язові клітини за участю мікроРНК-378**

Важливу роль у багатьох клітинних процесах відіграє мікроРНК-378 [27,30]. У дослідженні, проведеному командою науковців під керівництвом Jeffrey Gagan у 2011 р., встановлено роль мікроРНК-378 у мітохондріальному енергетичному гомеостазі клітини та пов'язаних із ним біологічних процесах, таких як розвиток, диференціювання і регенерація м'язів [11]. В експериментальних дослідженнях цих науковців визначено та пізніше іншими дослідниками підтверджено, що експресія мікроРНК-378 підвищена під час диференціювання скелетних м'язів [11,14].

Механізм диференціації фібробластів у гладком'язові клітини (гладкі міоцити, лейоміоцити) відбувається таким чином. Білок диференціації фібробластів MyoD (*myoblast determination protein*) бере участь у пригніченні активних антагоністів MyoR (*myogenic repressor*, міогенний репресор), тим самим сприяє розвитку міоцитів. Протеїн MyoR запобігає MyoD-опосередкованому трансдиференціюванню фібробластів (рис. 1) [11,14]. Роль MyoD у процесах міогенезу і регенерації м'язів складається в активації фібробластів для розмноження і диференціації в гладкі міоцити [11].

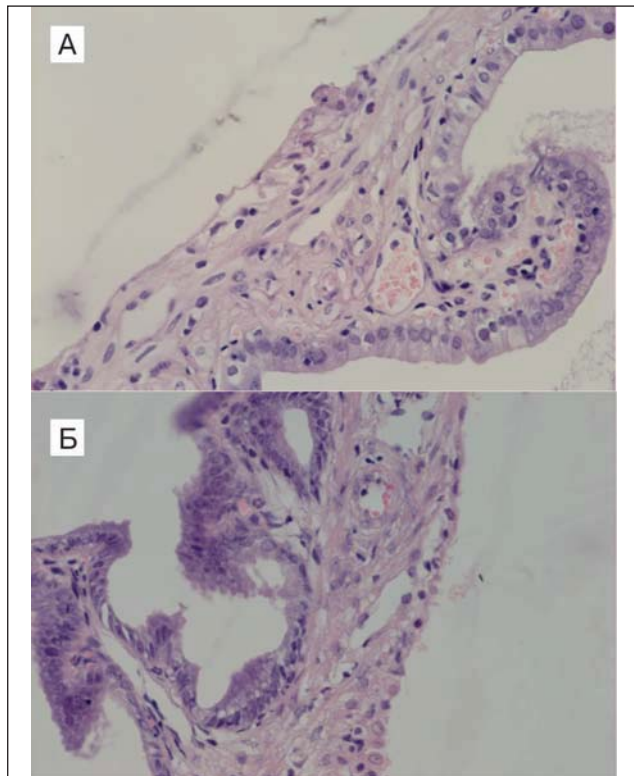
МікроРНК-378 індукує транскрипційну активність білка диференціації фібробластів MyoD, частково шляхом сайленсингу його антагоніста MyoR, оскільки 3'-нетрансльовані



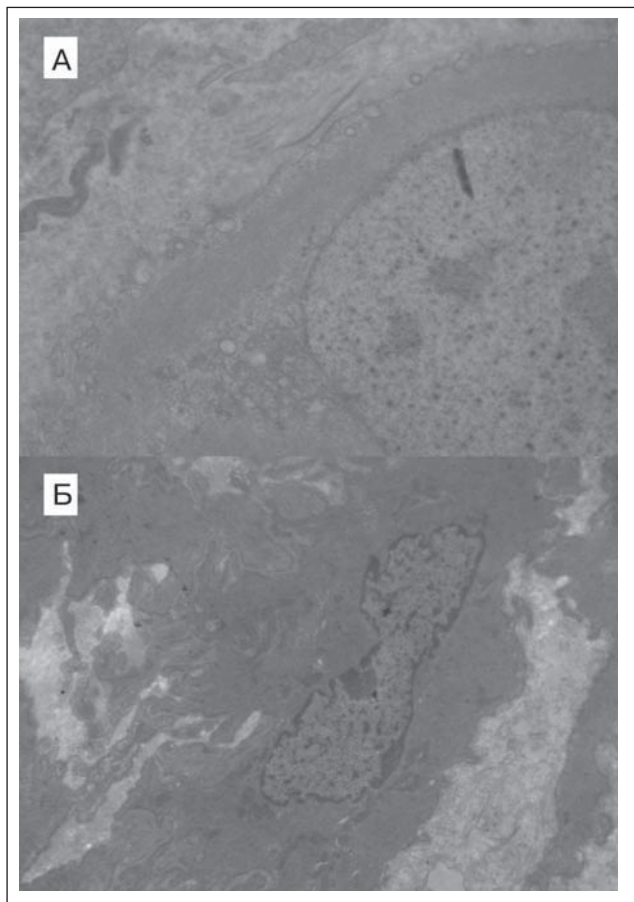
Примітки: MyoD (myoblast determination protein) — білок диференціації фібробластів; MyoR (myogenic repressor) — міогенний репресор.

**Рис. 1.** Схема механізму диференціації фібробластів у гладком'язові клітини за участю мікроРНК-378





**Рис. 2.** Гістологічна мікрофотографія печінкової стінки дна жовчного міхура миші в експериментальній (А) та контрольній групах (Б). Зафарбовування гематоксиліном та еозином.  $\times 400$



**Рис. 3.** Електронна мікрофотографія фрагмента лейоміоциту м'язової оболонки печінкової стінки тіла жовчного міхура миші в експериментальній (А,  $\times 12000$ ) та контрольній групах (Б,  $\times 10000$ )

ділянки MyoR містять сайт прямого зв'язування для мікроРНК-378 [11]. Інгібування трансляції MyoR мікроРНК-378 сприяє регенерації м'язів (рис. 1) [11,14].

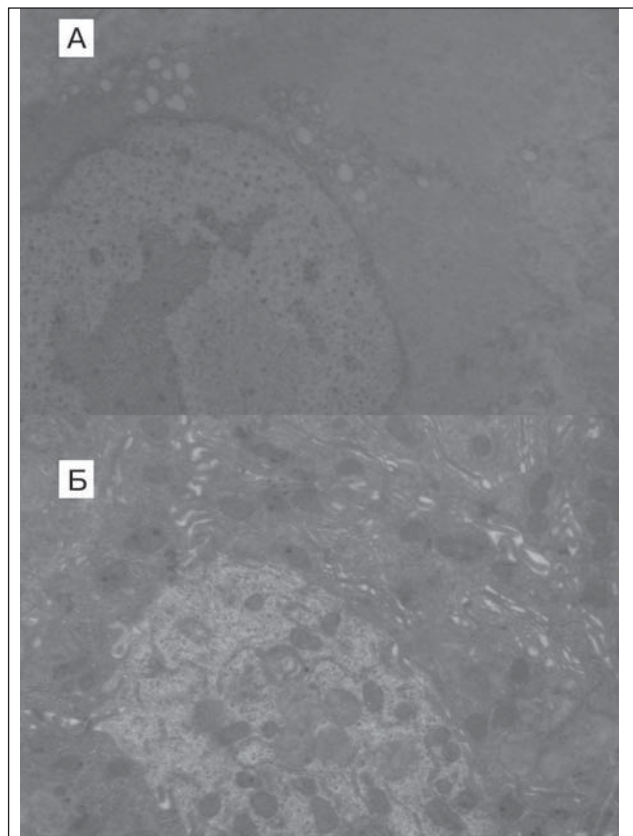
Регулювання переходу фібробластів у гладком'язові клітини відбувається завдяки системі, яка дає змогу тонко регулювати кількість гладком'язових клітин залежно від апоптозу, пошкодження та необхідності їх функціонування. Якщо рівень експресії мікроРНК-378 підвищується, то відбувається блокування синтезу міогенного репресора MyoR, тому білок диференціації фібробластів MyoD синтезується в достатній кількості й відбувається перехід фібробластів у гладком'язові клітини.

Отже, беручи до уваги результати власних досліджень і враховуючи вищезазначене, нами запропонована гіпотеза щодо можливості під впливом УДХК через підвищений рівень експресії мікроРНК-378 заблокувати синтез міогенного репресора MyoR, активізувати білок диференціації фібробластів MyoD і підвищити, таким чином, диференціацію фібробластів у гладком'язові клітини стінки ЖМ на експериментальній моделі мишей. Оскільки в дітей УДХК позитивно впливає на скорочувальну функцію ЖМ, ми вважаємо, що це відбувається за рахунок підвищення рівня експресії мікроРНК-378f та гіперплазії гладких міоцитів м'язової оболонки стінки ЖМ.

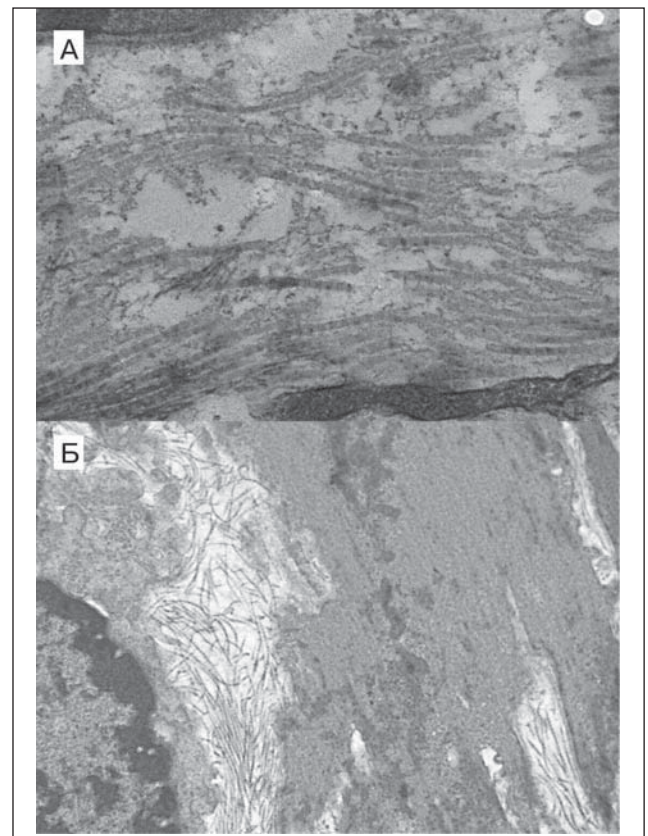
Для підтвердження гіпотези проведено дослідження експериментальної групи мишей за умовами введення препарату УДХК і контрольної групи мишей, яким внутрішньошлунково вводили дистильовану воду.

**Гістологічні та ультраструктурні зміни клітин м'язової оболонки стінки жовчного міхура мишей під впливом урсодезоксихолевої кислоти**

При дослідженні за допомогою світлооптичної мікроскопії у складі м'язової оболонки стінки ЖМ тварин обох досліджуваних груп візуалізувалося пухке сітчастоподібне розташування гладких міоцитів (лейоміоцитів). Клітини мали видовжену веретеноподібну форму з поодинокими відростками. Розміри лейоміоцитів в обох групах тварин були довжиною 15–25 мкм і діаметром 3–7 мкм. Стінка дна та тіла жовчного міхура була представлена поздовжньо та косо орієнтованими міоцитами і значними прошарками ендомізії зі значною кількістю мікросудинних і нервових елементів (рис. 2).



**Рис. 4.** Електронна мікрофотографія цитоплазми лейоміоциту м'язової оболонки стінки дна жовчного міхура миші в експериментальній (А,  $\times 12000$ ) та контрольній групах (Б,  $\times 10000$ )



**Рис. 5.** Електронна мікрофотографія колагенового матрикса ендомізію м'язової оболонки вісцеральної стінки тіла жовчного міхура миші в експериментальній (А,  $\times 25000$ ) та контрольній групах (Б,  $\times 15000$ )

Після впливу УДХК гістологічно визначалися ознаки гіперплазії лейоміоцитів стінки ЖМ. Мітотичні індекси міоцитів стінки дна ( $1,794 \pm 0,103\%$ ) і тіла ( $1,607 \pm 0,095\%$ ) ЖМ експериментальної групи мишей виявлялися достовірно частіше порівняно з контрольною групою мишей ( $0,946 \pm 0,058\%$  і  $0,873 \pm 0,061\%$  відповідно), ( $p < 0,01$ ). Вірогідно значуща велика кількість апоптотичних фігур міоцитів стінки дна ( $0,762 \pm 0,046\%$  проти  $0,225 \pm 0,016\%$ ) і тіла ( $0,598 \pm 0,038\%$  проти  $0,247 \pm 0,021\%$ ) ЖМ спостерігалася в експериментальній групі мишей ( $p < 0,01$ ).

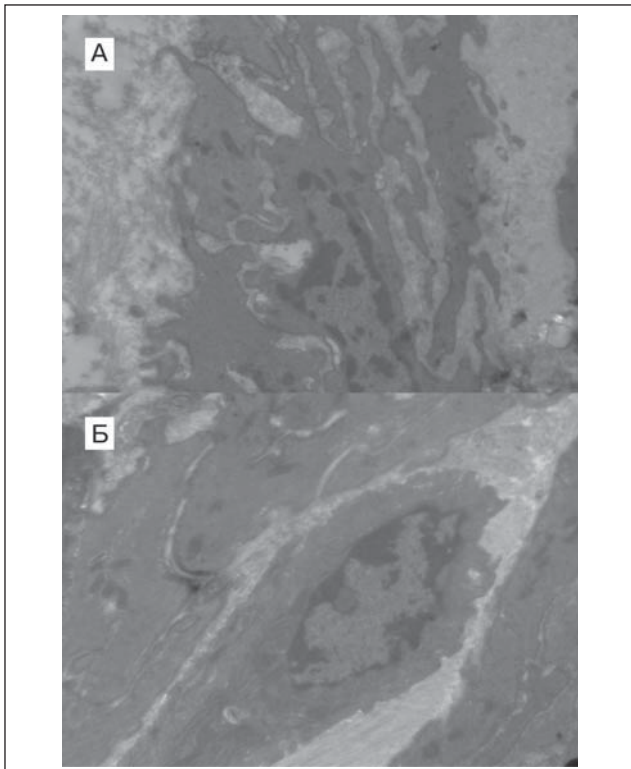
Типова ультраструктурна будова цитоплазми, ядер і клітинної поверхні лейоміоцитів ЖМ обох досліджуваних груп зображена на рис. 3. Активність ядер інтерфазних міоцитів не відрізнялася в досліджуваних групах. Звичайну будову і локалізацію в цитоплазмі міоцитів також мали й органели загального призначення.

Невеликі мітохондрії розташовувалися поблизу ядра та мали відмінності в клітинах різних досліджуваних груп (рис. 4).

Питома площа поверхні мітохондріальних крист клітин дна ЖМ у мишей експериментальної групи становила  $5,32 \pm 0,39$  мкм/мкм<sup>2</sup>, клітин тіла ЖМ —  $3,85 \pm 0,31$  мкм/мкм<sup>2</sup> і достовірно відрізнялася від показників мишей контрольної групи — відповідно  $2,04 \pm 0,15$  мкм/мкм<sup>2</sup> й  $1,43 \pm 0,12$  мкм/мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,01$ ). Щільність мікропіноцитозних везикул цитоплазми лейоміоцитів мишей після дії УДХК (тіло —  $46,1 \pm 3,6$  мкм<sup>-2</sup>) вірогідно перевищувала значення показників тварин контрольної групи (тіло —  $20,5 \pm 1,8$  мкм<sup>-2</sup>), ( $p < 0,01$ ). Достовірне зростання кількості кавеол на поверхні плазмалеми спостерігалася після введення УДХК (дно —  $67,6 \pm 4,9$  мкм<sup>-1</sup>; тіло —  $44,1 \pm 3,5$  мкм<sup>-1</sup>), на відміну від групи, яка не отримувала препарату (дно —  $23,5 \pm 2,1$  мкм<sup>-1</sup>; тіло —  $13,9 \pm 1,5$  мкм<sup>-1</sup>), ( $p < 0,01$ ). Для клітин м'язової оболонки стінки шийки ЖМ зміни не були характерними.

Пучки актинових філаментів являли собою спеціалізовані скоротливі структури міоцитів. Пучки актинових філаментів розташовувалися поздовжньо або косо відносно довгої





**Рис. 6.** Електронна мікрофотографія інтерстиційних клітин ендомізії м'язової оболонки стінки тіла жовчного міхура миші в експериментальній (А,  $\times 4000$ ) та контрольній групах (Б,  $\times 8000$ )

осі клітин. Насиченість цитоплазми актиновими філаментами спостерігалася після дії УДХК протягом 1 місяця.

Фібробласти веретеноподібної форми з незначною кількістю відростків спостерігалися між пухко розташованими міоцитами в стінці тіла ЖМ мишей експериментальної та контрольної груп. виявлялися звичайні фібробласти. З лейоміоцитами фібробласти не контактували. Фібробласти не утворювали організованих пучків та були оточені еластичними й тонкими колагеновими волокнами (рис. 5). У шийці ЖМ обох досліджуваних груп прошарки ендомізії були значно вужчими і містили щільніші фібрили.

Після дії УДХК відзначалося вірогідне зростання ядерної активності фібробластів за рахунок деконденсації хроматину та збільшення кількості ядерних пор ( $p < 0,01$ ). Співвідношення конденсованого і деконденсованого хроматину ядер фібробластів дна м'язової оболонки ЖМ мишей експериментальної групи становило  $0,106 \pm 0,007$ , тіла —  $0,121 \pm 0,009$ , шийки —  $0,094 \pm 0,008$ , на відміну від вказаного показника в мишей контрольної групи (дна —  $0,253 \pm 0,018$ , тіла —  $0,195 \pm 0,016$ , шийки —  $0,206 \pm 0,015$ ), ( $p < 0,01$ ).

У складі ендомізії м'язової оболонки стінки ЖМ мишей в обох досліджуваних групах зустрічалися гетероморфні інтерстиційні клітини Кахаля (телоцити) (рис. 6). За розмірами тіла клітин Кахаля варіювали від 8 до 30  $\mu\text{m}$  і містили від 2 до 8 відростків. Характерними для інтерстиційних клітин Кахаля були численні контакти відростків із мембраною сусідніх лейоміоцитів. Окремі телоцити з 2–3 відростками розташовувалися вздовж нервових волокон або контактували з нервовими закінченнями в товщі ендомізії.

Суттєве вірогідне збільшення кількості інтерстиційних клітин Кахаля в м'язовій оболонці дна ( $4,61 \pm 0,37 \text{ мм}^2$ ) і тіла ( $5,48 \pm 0,40 \text{ мм}^2$ ) ЖМ мишей спостерігалося після введення УДХК у протилежність значенням, отриманим у мишей, які не отримували УДХК (дно —  $2,77 \pm 0,23 \text{ мм}^2$ , тіло —  $2,06 \pm 0,19 \text{ мм}^2$ ), ( $p < 0,01$ ). Вказані зміни не відбувалися в ділянці сфінктера шийки ЖМ. Ультраструктурні ознаки ядерної та цитоплазматичної активності інтерстиційних клітин Кахаля не відрізнялися від показників контрольної групи тварин. Не спостерігалося будь-яких змін у структурі контактів телоцитів із лейоміоцитами або нервовими елементами.

Результати експериментального дослідження мишей підтверджують запропоновану гіпотезу. Виявлено, що після дії УДХК відмічаються гістологічні ознаки гіперплазії лейоміоцитів і зростання ядерної активності фібробластів м'язової оболонки стінки ЖМ мишей. Ультраструктурні зміни гладких міоцитів м'язової стінки ЖМ експериментальних мишей вказують на зміни їх скоротливої діяльності на внутрішньоклітинному рівні.

На відміну від загального уявлення про антиапоптотичний ефект УДХК на епітеліальні клітини гепатобіліарної системи [23], активація апоптозу гладких міоцитів може бути пов'язана з неврегульованим характером надлишкової активації гіперпластичних процесів, що виникає за нормальних умов при введенні УДХК.

Вказані вірогідні зміни з боку мітохондрій і поверхневих структур лейоміоцитів безпосередньо пов'язані з транспортом іонів кальцію в цитоплазму міоцитів для ініціації скорочення. Це вказує на стимуляцію скоротливої діяльності лейоміоцитів із боку УДХК.

Отже, ультраструктурний аналіз лейоміоцитів м'язової оболонки мишей показує декілька важливих особливостей. Визначена вірогідна різниця між групою тварин після введення УДХК та групою інтактних тварин. Гіпертрофія м'язової оболонки в експериментальній групі на тлі гіперплазії гладких міоцитів і численних апоптозів відбувається не на тканинному, а на внутрішньоклітинному рівні. Гіпертрофія м'язової оболонки в мишей експериментальної групи відбувається за рахунок збільшення вмісту та активності елементів скоротливого та енергетичного апарату лейоміоцитів, а також транспорту іонів кальцію.

Активна перебудова структури ендомізію спостерігається в м'язовій оболонці ЖМ мишей експериментальної групи. Це підтверджено наявністю незрілих колагенових фібрил поряд зі звичайними посмугованими волокнами. На наш погляд, це пов'язано з паралельними гіперпластичними і апоптотичними процесами у м'язовій оболонці ЖМ, які відбуваються під впливом УДХК. Зазначені процеси потребують прискорених перетворень інтерстицію.

Гістологічна будова м'язової оболонки стінки ЖМ представлена, окрім гладких міоцитів, численною кількістю інтерстиційних клітин у складі розвиненого ендомізію. Серед інтерстиційних клітин м'язової оболонки стінки ЖМ відокремлюють клітини Кахаля, які багаті мітохондріями, кавеолами та утворюють тісні зв'язки між собою та з гладкими міоцитами [6]. Результати наукових досліджень підтверджують роль інтерстиційних клітин Кахаля в генерації і поширенні спонтанної ритмічності, а також збудливості ЖМ [15]. Припускаємо, що підвищення щільності телочитів у м'язовій оболон-

ці призводить до стимуляції моторики стінки ЖМ. Враховуючи сучасні уявлення про пейсмеркерну роль інтерстиційних клітин Кахаля в ініціації скорочення гладком'язових комплексів, можна припустити, що важливим механізмом дії УДХК є стимуляція моторики стінки ЖМ.

### Висновки

У дітей з ФР ЖМ та СФО на тлі холеретичної терапії під впливом УДХК регресують клінічні прояви больового абдомінального, диспептичного та астено-вегетативного синдромів, нормалізуються змінені біохімічні маркери холестази й гепатоцитолізу та підвищується знижена скоротливість ЖМ. Застосування УДХК у холеретичній терапії ФР ЖМ та СФО в дітей є безпечним та обґрунтованим за рахунок її високої ефективності.

Результати молекулярно-генетичних досліджень свідчать про унікальну властивість УДХК впливати на активність генерації мікроРНК-378f, яка є генним регулятором клітинних механізмів, що впливають на експресію генів на посттранскрипційному рівні. Вплив УДХК у лікуванні ФР ЖМ та СФО в дітей призводить до підвищення рівня експресії мікроРНК-378f у сироватці крові.

Застосування УДХК викликає гіперплазію лейоміоцитів та їх внутрішньоклітинні ультраструктурні зміни, зростання ядерної активності фібробластів і збільшення кількості інтерстиційних клітин Кахаля м'язової оболонки стінки ЖМ в експериментальних тварин. Дані морфологічні зміни, вірогідно, обумовлюють підвищення скоротливої функції ЖМ.

*Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.*

### REFERENCES/ЛІТЕРАТУРА

1. Abaturov AE, Babych VL. (2019). Prediction of choleretic therapy of functional disorders of the gallbladder and Oddi's sphincter in children. *Child's health*. 7 (14): 12–20. [Абатуров ОЕ, Бабиш ВЛ. (2019). Прогнозування ефективності холеретичної терапії функціональних розладів жовчного міхура та сфінктера Одді в дітей. *Здоров'я дитини*. 7 (14): 12–20].
2. Abaturov AE, Babych VL. (2021). The world of microRNAs of the hepatobiliary system *Child's health*. 1 (16): 122–131. [Абатуров ОЕ, Бабиш ВЛ. (2021). Світ мікроРНК гепатобіліарної системи. *Здоров'я дитини*. 1 (16): 122–131].
3. Abaturov AE, Vysochyna IL, Babych VL, Dosenko VE. (2020). Regulation of microRNA expression level by choleretic therapy in functional disorders of the gallbladder and Oddi's sphincter in children. *Wiadomości Lekarskie*. 73 (1): 41–45.
4. Bartel DP. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 173: 20–51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
5. Belousova O, Voloshyna L, Hanzii O, Babadzhanyan O, Slobodianiuk O. (2018). Experience of using ursodeoxycholic acid in the therapy of biliary sludge in children. *Child's health*. 13 (1): 41–49. [Белоусова ОЮ, Волошина ЛГ, Ганзій ОБ, Бабаджанян ОМ, Слободянюк ОЛ. (2018). Досвід використання урсодеохсиколієвої кислоти в терапії біліарного складу в дітей. *Здоров'я дитини*. 13 (1): 41–49]. doi: 10.22141/2224-0551.13.0.2018.131177.
6. Ding R, Wei J, Xu J. (2019) Gallbladder interstitial Cajal-like cells and gallbladder contractility in patients with cholelithiasis: a prospective study. *Folia Histochem Cytobiol*. 57 (2): 94–100. doi: 10.5603/FHC.a2019.0011. Epub 2019 Jun 25.
7. Drossman DA. (2016). Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. *Gastroenterology*. 150 (6): 1262–1279. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.032.
8. Efe C, Taşçılar K, Henriksson I, Lytvak E, Alalkim F et al. (2019). Validation of Risk Scoring Systems in Ursodeoxycholic Acid-Treated Patients With Primary Biliary Cholangitis.



- American Journal of Gastroenterology. 114 (7): 1101–1108. doi: 10.14309/ajg.0000000000000290.
9. European Association for the Study of the Liver (EASL). (2016). EASL Clinical Practice Guidelines on the prevention, diagnosis and treatment of gallstones. *J Hepatol.* 65 (1): 146–181. doi: 10.1016/j.jhep.2016.03.005.
10. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. (1986). *European Treaty Series 123.* Strasbourg, France: Council of Europe.
11. Gagan J, Dey BK, Layer R, Yan Z, Dutta A. (2011). MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. *J Biol Chem.* 286 (22): 19431–19438. doi: 10.1074/jbc.M111.219006.
12. Kharitonova LA. (2020). The place of cholelithiasis in the conservative treatment of diseases of the biliary tract in children. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 173 (1): 111–120. [Харитонов ЛА. (2020). Место холелитиаза в консервативной терапии заболеваний билиарного тракта у детей. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 173 (1): 111–120]. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-173-1-111-120.
13. Kim DJ, Chung H, Ji SC et al. (2019). Ursodeoxycholic acid exerts hepatoprotective effects by regulating amino acid, flavonoid, and fatty acid metabolic pathways. *Metabolomics.* 15: 30. doi: 10.1007/s11306-019-1494-5.
14. Krist B, Florczyk U, Pietraszek-Gremplewicz K, Józkowicz A, Dulak J. (2015). The Role of miR-378a in Metabolism, Angiogenesis, and Muscle Biology. *International Journal of Endocrinology.* ArticleID281756: 13. doi: 10.1155/2015/281756.
15. Lavoie B, Balemba OB, Nelson MT, Ward SM, Mawe GM. (2007). Morphological and physiological evidence for interstitial cell of Cajal-like cells in the guinea pig gallbladder. *J Physiol.* 579 (2): 487–501. doi: 10.1113/jphysiol.2006.122861.
16. Liddle RA. (1994). Regulation of cholecystokinin synthesis and secretion in rat intestine. *J Nutr.* 124 (48): 1308S–1314S. doi: 10.1093/jn/124.suppl\_8.1308s.
17. López-Riera M, Conde I, Castell JV, Jover R. (2020). A Novel MicroRNA Signature for Cholestatic Drugs in Human Hepatocytes and Its Translation into Novel Circulating Biomarkers for Drug-Induced Liver Injury Patients. *Toxicological Sciences.* 2 (173): 229–243. doi: 10.1093/toxsci/kfz138.
18. Ministry of Health of Ukraine. (2013). Unified clinical protocols of medical care for children with diseases of the digestive system. Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 59 of January 29. *Sovremennaya pedyatrya.* 4: 20–31. [Міністерство охорони здоров'я. (2013). Уніфікований клінічний протокол медичної допомоги дітям із захворюваннями органів травлення. Наказ Міністерства охорони здоров'я України №59 від 29.01.2013. *Современная педиатрия.* 4: 20–31].
19. Ministry of Health of Ukraine. (2018). Annual report on the state of health of the population, sanitary and epidemiological situation and the results of the health care system of Ukraine, 2017. Ukrainian Institute for Strategic Studies of the Ministry of Health of Ukraine. Kyiv: IEC Medinform: 458. [МОЗ України. (2018). Щорічна доповідь про стан здоров'я населення, санітарно-епідемічну ситуацію та результати діяльності системи охорони здоров'я України, 2017 р. Український інститут стратегічних досліджень МОЗ України. Київ: МВЦ Медінформ: 458]. doi: 10.32471/umj.1680-3051.129.137062.
20. Parkhomenko L, Strashok L, Isakova M, Yeshchenko A, Khomenko M, Pavlova O, Kvaratskheliya T. (2018). Improving the diagnosis and treatment of hepatobiliary pathology in adolescents with obesity. *Child's health.* 13 (1): 58–62. [Пархоменко ЛК, Страшок ЛА, Ісакова МЮ, Єщенко АВ, Хоменко МА, Павлова ОС, Кварацхелія ТМ. (2018). Удосконалення діагностики й лікування гепатобілярної патології в підлітків з ожирінням. *Здоров'я ребенка.* 13 (1): 58–62]. doi: 10.22141/2224-0551.13.0.2018.131180.
21. Pierce E. (1962). *Histochemistry: Per. from English.* Moscow: Publishing house in. lit: 962. [Пирс Э. (1962). *Гистохимия: Пер. с англ.* Москва: Изд-во ин. Лит: 962].
22. Rebrova OYu. (2006). Statistical analysis of medical data. Application of the application package STATISTICA. Moscow: MediaSphere: 312. [Реброва ОЮ. (2006). Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: МедиаСфера: 312].
23. Rockey DC. (2013). Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 224–231. doi: 10.1016/j.cgh.2013.01.005.
24. Sarkisov DS, Perova YL. (1996). *Microscopic technique.* Moscow: Medicine: 542. [Саркисов ДС, Перова ЮЛ. (1996). *Микроскопическая техника.* Москва: Медицина: 542].
25. Shanmugam H, Molina Molina E, Di Palo DM et al. (2020). Physical Activity Modulating Lipid Metabolism in Gallbladder Diseases. *J Gastrointest Liver Dis.* 29 (1): 99–110. doi: 10.15403/jgld-544. PMID: 32176752. PMCID: PMC8114792.
26. Simon DA, Friesen CA, Schurman JV, Colombo JM. (2020). Biliary Dyskinesia in Children and Adolescents: A Mini Review. *FrontPediatr.* 8: 122. doi: 10.3389/fped.2020.00122. PMID: 32266192. PMCID: PMC7105807.
27. Sun X, Liu K, Zhao Y, Zhang T. (2022). High miRNA-378 expression has high diagnostic values for pulmonary tuberculosis and predicts adverse outcomes. *BMC molecular and cell biology.* 23 (1): 14. doi: 10.1186/s12860-022-00413-w. PMID: 35305574. PMCID: PMC8934448.
28. Verkhovna Rada of Ukraine. (2006). On the protection of animals from cruelty. Law of Ukraine. [Верховна Рада України. (2006). Про захист тварин від жорстокого поводження. Закон України]. URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
29. Volosovec OP, Zubarenko OV, Kryvopustov SP et al. (2017). *Pediatrics (Gastroenterology and Pathology of the Early Age): Teach. Manual.* Odessa: Printing house, Printing South: 165–180. [Волосовец ОП, Зубаренко ОВ, Кривопустов СП та ін. (2017). *Педіатрія (гастроентерологія та патологія раннього віку): навч. посібник.* Одеса: Друкарський дім, Друк Південь: 165–180].
30. Wang H, Song Y, Wu Y, Kumar V, Mahato RI, Su Q. (2021). Activation of dsRNA-Dependent Protein Kinase R by miR-378 Sustains Metabolic Inflammation in Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes.* 70 (3): 710–719. doi: 10.2337/db20-0181.
31. Wasik U, Kempinska-Podhorodecka A, Bogdanos DP et al. (2020). Enhanced expression of miR-21 and miR-150 is a feature of anti-mitochondrial antibody-negative primary biliary cholangitis. *Mol Med.* 26: 8. doi: 10.1186/s10020-019-0130-1.

#### Відомості про авторів:

**Абатуров Олександр Євгенович** – д.мед.н., проф., зав. каф. педіатрії 1 та медичної генетики Дніпровського ДМУ. Адреса: м. Дніпро, вул. Вернадського, б. 9. <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorid=650723302>. <https://orcid.org/0000-0001-6291-5386>.

**Твердохліб Ігор Володимирович** – д.мед.н., проф., зав. каф. гістології Дніпровського ДМУ. Адреса: м. Дніпро, вул. Вернадського, б. 9. <https://orcid.org/0000-0002-8672-3773>.

**Бабич Вероніка Леонідівна** – д.філос., асистент каф. педіатрії 1 та медичної генетики, Дніпровського ДМУ. Адреса: м. Дніпро, вул. Вернадського, б. 9. <https://orcid.org/0000-0001-9261-9051>.

**Русаків Олена Олександрівна** – к.мед.н., доц., доц. каф. педіатрії 1 та медичної генетики Дніпровського ДМУ. Адреса: м. Дніпро, вул. Вернадського, б. 9. Стаття надійшла до редакції 11.05.2022 р., прийнята до друку 03.09.2022 р.