

ВЛИЯНИЕ АКТГ₄₋₇-PGP (СЕМАКСА) НА МОРФОЛОГИЮ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА

© Шепелева О.М.¹, Иванов А.В.², Бобынцев И.И.³, Крюков А.А.³, Андреева Л.А.⁴, Мясоедов Н.Ф.⁴

¹ Кафедра общей гигиены, ² кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, ³ кафедра патофизиологии Курского государственного медицинского университета, Курск;

⁴ Институт молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: bobig@mail.ru

Острое эмоционально-болевое воздействие на крыс вызывает развитие стрессовой реакции, что подтверждается развитием слабовыраженной акцидентальной инволюции тимуса и сопровождается комплексом стрессиндуцированных изменений паренхимы печени в виде расширения синусоидных капилляров, нарушения балочной структуры паренхимы и признаков гидропической дистрофии. Внутривентральное введение АКТГ₄₋₇-PGP (семакса) крысам в условиях острого эмоционально-болевого стресса вызвало снижение выраженности признаков акцидентальной инволюции вилочковой железы, нормализацию структуры паренхимы, уменьшения площади и степени выраженности признаков гидропической дистрофии, увеличение количества многоядерных гепатоцитов.

Ключевые слова: гепатоциты, стресс, аналог АКТГ, семакс, печень.

THE EFFECT OF ACTH₄₋₇-PGP PEPTIDE (SEMAX) ON THE LIVER STRUCTURE IN RATS UNDER ACUTE FOOT-SHOCK STRESS

Shepeleva O.M.¹, Ivanov A.V.², Bobyntsev I.I.³, Kryukov A.A.³, Andreeva L.A.⁴, Myasoedov N.F.⁴

¹ Department of General Hygiene, ² Department of Histology, Embryology, and Cytology,

³ Department of Pathological Physiology of Kursk State Medical University, Kursk;

⁴ Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow

The acute foot-shock stress in rats develops a stress reaction, which is confirmed by accidental involution of the thymus and a set of stress-induced changes in the liver parenchyma in the form of the sinusoidal capillary dilation, discomplexation of hepatic beams and the signs of hydropic dystrophy. The intraperitoneal injection of ACTH₄₋₇-PGP (Semax) under foot-shocked stress caused mitigation of the thymus accidental involution, parenchymal structure recovery, reduction in size and severity of hepatic hydropic degeneration, and increase in the number of poly-nucleolus hepatocytes.

Keywords: hepatocytes, stress, an analogue of ACTH, semax, liver.

Известно, что стрессорное воздействие на организм сопровождается различными патологическими изменениями в печени. В механизмах их развития важную роль играют нарушения микроциркуляции, гипоксия тканей [3], прооксидантно-антиоксидантный дисбаланс клеток с развитием перекисного окисления липидов клеточных мембран [7, 8].

Учитывая механизмы стрессиндуцированных сдвигов в печени в поиске стресспротективных средств, представлялось целесообразным использование регуляторных пептидов, которые обладают полифункциональным действием и не оказывают токсического действия [2]. В частности, синтетический аналог фрагмента АКТГ₄₋₁₀ семакс широко используется в клинической практике. В культуре ткани семакс оказывал выраженное антиоксидантное, антигипоксическое [1], ангиопротекторное [6] и нейротрофическое действие [9].

С учетом спектра биологической активности семакса являлось целесообразным изучение его влияния на стрессиндуцированные сдвиги в печени. Также непосредственный практический интерес могут представлять сведения о локализации и

виде повреждений паренхимы печени при остром эмоционально-болевым стрессе. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение состояния паренхимы печени в условиях острого эмоционально-болевого стресса (ОЭБС) и при воздействии данного пептида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 60 крысах-самцах Вистар массой 220-250 г, разделенных на группы по 10 животных, содержащихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и контролируемой температуре (22±2°C). Все манипуляции с животными проводили с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и в соответствии с решением регионального этического комитета.

В работе использовали фрагмент N-терминального конца АКТГ Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (АКТГ₄₋₇-PGP), синтезированный в Институте

молекулярной генетики РАН. Пептид растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно за 15 мин до начала стрессорного воздействия. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы тела.

ОЭБС создавали электрокожным раздражением лап попарно сгруппированных животных в камере с электрифицированным решетчатым полом. С помощью программируемого электростимулятора на пол камеры в течение 30 минут подавались импульсы тока силой 0,2-0,3 мА продолжительностью 5 секунд с межимпульсным интервалом 15 секунд [4, 5]. По окончании стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента обескровливанием под эфирным наркозом путем забора крови из правого желудочка сердца.

Определяли массу печени и тимуса, а также их массовые индексы по формуле: индекс органа = $m_{\text{органа}}/m_{\text{животного}} \times 1000$.

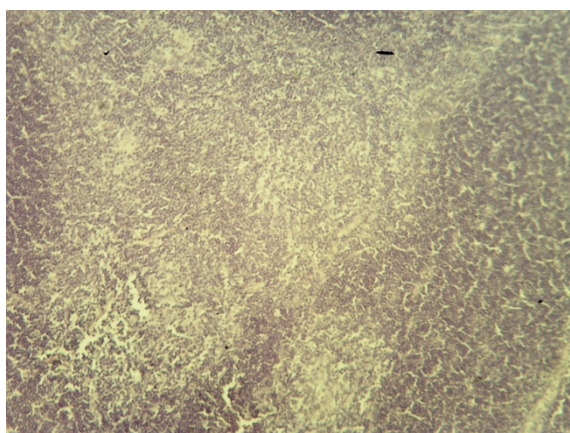
Состояние гепатоцитов и оценку распределения поражений в печеночной дольке, а также реакцию вилочковой железы на стресс оценивали по микрофотографиям парафиновых срезов тол-

щиной 5-7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Микрофотографирование осуществляли с помощью оптической системы, состоящей из микроскопа Leica CME и окуляр-камеры DCM-510. Морфометрию проводили с помощью пакета программ Image J. Определяли количество одно- и двоядерных, одно- и многоядрышковых гепатоцитов в центральном и периферическом отделах печеночных долек.

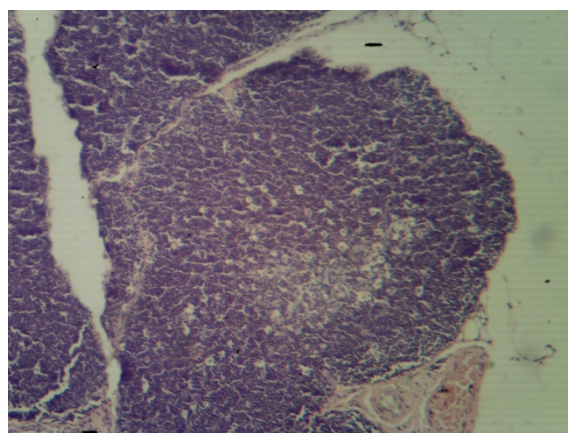
Достоверность полученных результатов определяли по t-критерию Стьюдента и критерию Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

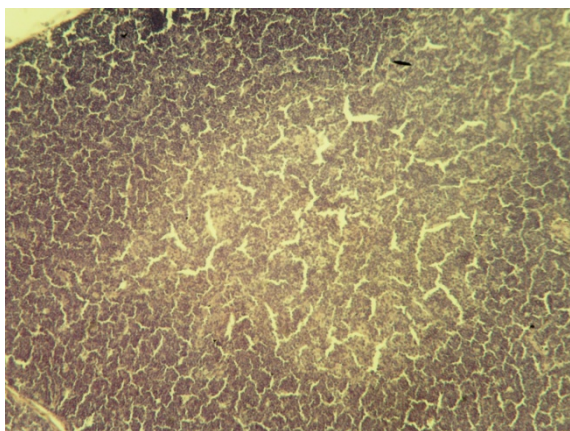
Установлено, что моделирование ОЭБС не привело к изменению индексов массы печени и тимуса. Тем не менее при исследовании гистологических препаратов обнаружено, что морфологическая картина тимуса при стрессе характеризовалась маловыраженными признаками акцидентальной инволюции в виде очаговой делимфатизации коркового вещества.



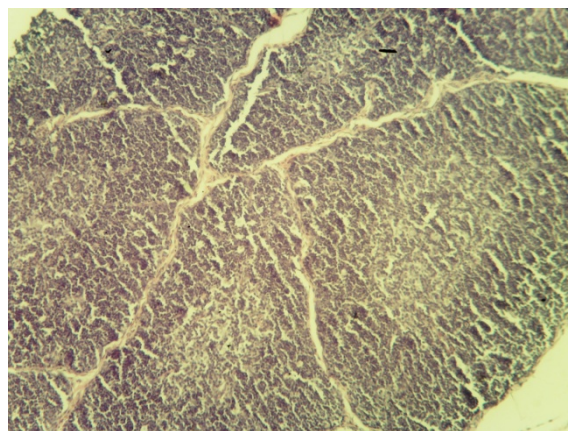
А



Б



В



Г

Рис. 1. Состояние тимуса крыс после моделирования ОЭБС на фоне введения АКГГ4-7-РГР в дозах 450 (А), 150 (Б), 50 (В) и 5 (Г) мкг/кг. Окраска гематоксин-эозином. Увеличение $\times 100$.

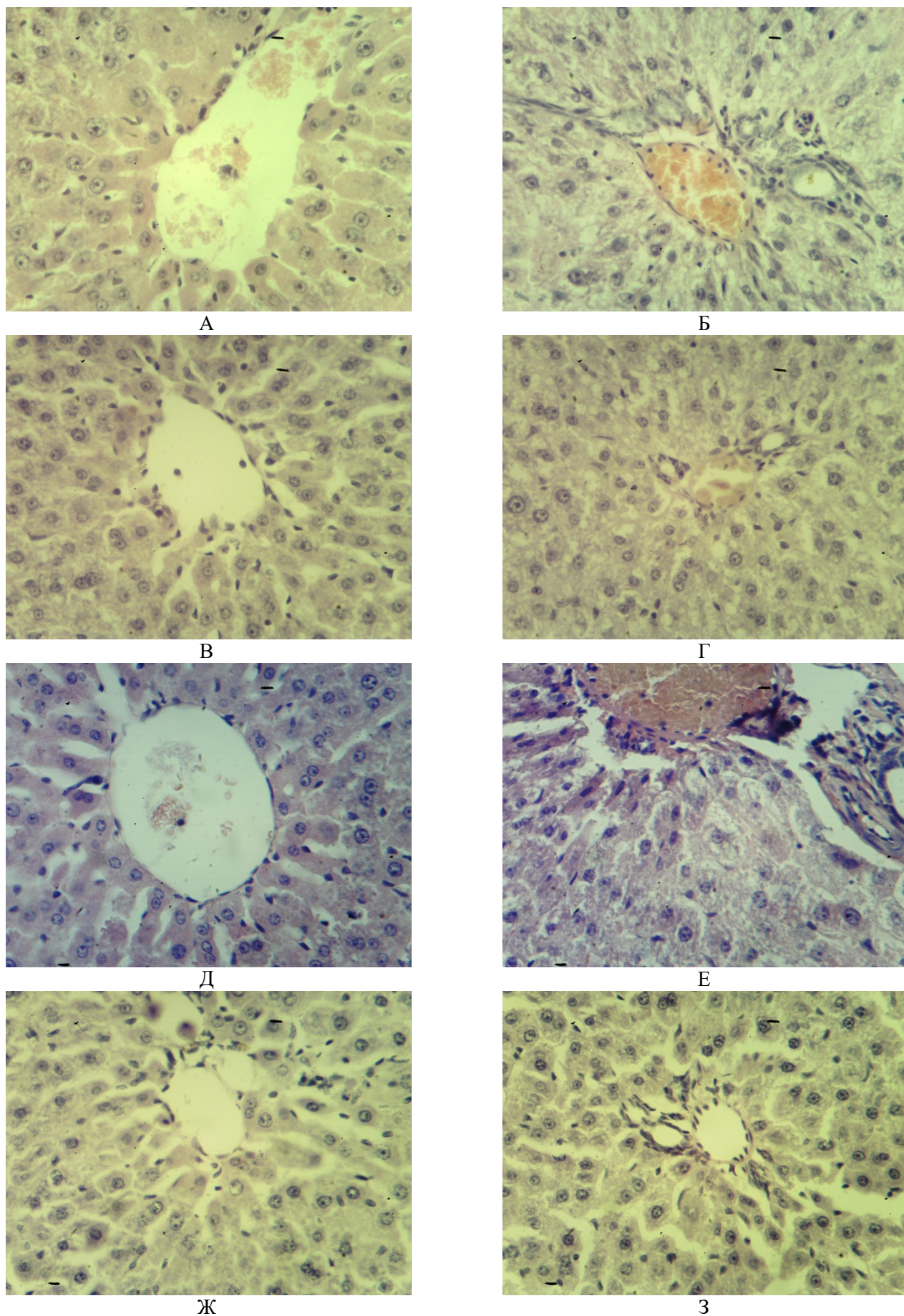


Рис. 2. Состояние печени крыс в центральном (А, В, Д, Ж) и периферическом (Б, Г, Е, З) отделах дольки после моделирования ОЭБС на фоне введения АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 450 (А, Б), 150 (В, Г), 50 (Д, Е) и 5 (Ж, З) мкг/кг. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100.

Состояние гепатоцитов в условиях ОЭБС на фоне введения АКТГ₄₋₇-PGP ($M \pm \sigma$)

Группа Процент гепатоцитов		Контроль без стресса	Стрессированные животные				
			Контроль	введение АКТГ ₄₋₇ -PGP в дозе (мкг/кг)			
				5	50	150	450
Центро- булярный отдел	Одноядерные	78,85±1,41	84,27±1,37*	88,55±1,6 ¹	81,78±1,36	83,53±1,35	84,21±1,06
	Многаядерные	21,15±1,41	15,73±1,37*	11,45±1,60 ¹	18,22±1,36	16,47±1,35	15,79±1,06
	Одноядрышковые	17,88±1,52	27,31±2,51*	23,88±1,86	19,72±2,34 ¹	26,11±1,73	18,87±2,03 ¹
	Многаядрышковые	82,11±1,52	72,69±2,51*	76,12±1,86	80,28±2,34 ¹	73,89±1,73	81,13±2,03 ¹
Перифери- ческий отдел	Одноядерные	85,52±1,20	86,82±1,32	89,12±1,25	86,93±1,09	85,85±0,61	88,35±0,84
	Многаядерные	14,48±1,20	13,18±1,32	10,88±1,25	13,07±1,09	14,15±1,38	11,65±0,84
	Одноядрышковые	24,35±1,95	31,94±3,03*	31,53±2,10	22,79±2,08 ¹	36,87±3,51	31,96±2,60
	Многаядрышковые	75,65±1,95	68,06±3,03*	68,47±2,10	77,21±2,08 ¹	63,13±3,51	68,04±2,60

Примечание: * – $p \leq 0,05-0,001$ по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу; ¹ – $p \leq 0,05-0,001$ по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу.

В печени наблюдались многочисленные расширения капиллярной сети с признаками дезорганизации балочной структуры паренхимы и белковой дистрофии по гидропическому типу, более выраженными в центральном и промежуточном отделах долики. При этом периферическая часть паренхимы оставалась относительно сохранной.

Введение препарата в дозах 450 и 5 мкг/кг приводило к относительному улучшению состояния вилочковой железы в части относительного уменьшения количества и размеров участков делимфатизации (рис. 1А, Г) вплоть до их полного отсутствия у части животных. Доза 50 мкг вызвала нормализацию структуры органа, тогда как при использовании дозы 150 мкг/кг не только усиливались проявления акцидентальной инволюции (рис. 1Б), но и наблюдалось уменьшение массы тимуса.

Состояние печени на фоне введения препарата характеризуется дозозависимым уменьшением степени выраженности признаков дистрофии (рис. 2). Так, доза 450 мкг/кг приводила к полному восстановлению структуры балок гепатоцитов в центральных отделах долики с сохранением слабовыраженных признаков белковой дистрофии только в промежуточных и периферических отделах. Дальнейшее уменьшение дозы (150 и 50 мкг/кг) вызывало увеличение размеров сохранной паренхимы, а в дозе 5 мкг/кг наблюдались лишь следы дистрофии в виде зернистости цитоплазмы и расширения капиллярной сети.

Изменение относительного числа одно- и многоядрышковых и одно- и многоядерных гепатоцитов в центральном и периферическом отделах долек при моделировании ОЭБС имело тенденцию к увеличению одноядерных и одноядрышковых клеток во всех отделах печеночной долики (табл. 2). Так, в центральнобулярном отделе количество одноядерных клеток увеличилось на 6,44% ($p \leq 0,01$), а одноядрышковых – на 23,76% ($p \leq 0,001$). В периферическом отделе относитель-

ное число одноядрышковых гепатоцитов возросло на 23,76% ($p \leq 0,05$), а число одноядерных клеток также имело тенденцию к увеличению – на 1,5%, но статистической достоверности не достигло.

Введение препарата в дозе 5 мкг/кг привело к увеличению числа лишь одноядерных клеток в центральнобулярной зоне – 5,07% ($p \leq 0,05$), тогда как в центральнобулярной зоне статистически значимых различий в количестве одноядерных и одноядрышковых клеток не наблюдалось. Увеличение дозы АКТГ₄₋₇-PGP до 50 мкг/кг потенцировало синтетическую функцию печени, что проявилось ростом числа многоядрышковых клеток в центральной зоне долики на 10,45% ($p \leq 0,05$) и в периферической – на 13,46% ($p \leq 0,01$). В дозе 450 мкг/кг препарат также вызывал рост относительного числа многоядрышковых клеток в центральной зоне долики на 11,61% ($p \leq 0,01$), без выраженного эффекта на ее центральнобулярную зону.

Таким образом, острое эмоционально-болевое воздействие на крыс вызывает развитие стрессовой реакции, что подтверждается развитием слабо выраженной акцидентальной инволюции тимуса и сопровождается комплексом стрессиндуцированных изменений паренхимы печени в виде расширения синусоидных капилляров, нарушения балочной структуры паренхимы и признаков гидропической дистрофии, имеющих разную степень выраженности в различных отделах печеночных долек. Вероятно, данные эффекты реализуются путем активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси с продукцией глюкокортикоидов, обладающих катаболическим эффектом. Это проявляется нарушением синтетической функции печени, что подтверждает снижение числа многоядрышковых гепатоцитов.

Введение препарата во всех использованных дозах оказывало общее стресслимитирующее воздействие, что выражалось в снижении выраженности признаков акцидентальной инволюции

вилочковой железы. Гепатопротекторный эффект препарата в отношении печени при экспериментальном ОЭБС проявляется в виде нормализации структуры паренхимы, уменьшения площади и степени выраженности признаков гидропической дистрофии, а в дозах 450 и 50 мкг/кг – восстановления синтетической функции печени, что подтверждалось относительным увеличением количества многоядрышковых гепатоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долотов О.В., Еремин К.О., Андреева Л.А., Новосадова Е.В., Раевский К.С., Мясоедов Н.Ф., Гривенников И.А. Семакс предотвращает гибель тирозингидроксилаза-положительных нейронов в смешанной нейроглиальной культуре клеток среднего мозга эмбрионов крысы в модели нейротоксического повреждения 6-гидроксидофамином // Нейрохимия. – 2015. – Т. 32, № 4. – С. 3-17.
2. Шабанов П.Д. Фармакология пептидных препаратов // Мед. акад. журн. – 2008. – Т. 8, № 4. – С. 3-23.
3. Arias I.M., Boyer J.L., Chisari F.V., Fausto N., Schachter D., Shafritz D.A. The Liver: Biology and Pathobiology. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – 1064 p.
4. Hranilovic D., Bucan M., Wang Y. Emotional response in dopamine D2L receptor-deficient mice // Behav. Brain Res. – 2008. – Vol. 195, N 2. – P. 246-250
5. Matthews D.B., Morrow A.L., O'Buckley T., Flanigan T.J., Berry R.B., Cook M.N., Mittleman G., Goldowitz D., Tokunaga S., Silvers J.M. Acute mild footshock alters ethanol drinking and plasma corticosterone levels in C57BL/6J male mice, but not DBA/2J or A/J male mice // Alcohol. – 2008. – Vol. 42, N 6. – P. 469-476.
6. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Limborska S.A., Skvortsova V.I., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. Effect of semax and its C-terminal fragment Pro-Gly-Pro on the expression of VEGF family genes and their receptors in experimental focal ischemia of the rat brain // Journal of Molecular Neuroscience. – 2013. – Vol. 49, N 2. – P. 328-333.
7. Sánchez-Valle V., Chávez-Tapia N.C., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review // Curr. Med. Chem. – 2012. – Vol. 19, N 28. – P. 4850-4860.
8. Selye H. Stress in Health and Disease. – Butterworth-Heinemann, 2013. – 1300 p.
9. Shadrina M., Kolomin T., Agapova T., Agniullin Y., Shram S., Slominsky P., Lymborska S., Myasoedov N. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action.// J. Mol. Neurosci. – 2010. – Vol. 41, N 1. – P. 30-35.