

## ВЛИЯНИЕ ВНУТРИБРЮШИННОГО ВВЕДЕНИЯ АКТГ-<sub>4-7</sub>-PRO-GLY-PRO НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

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

<sup>1</sup> Кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, <sup>2</sup> кафедра патофизиологии, <sup>3</sup> кафедра общей гигиены Курского государственного медицинского университета, Курск; <sup>4</sup> Отдел химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: [anatomy@mail.ru](mailto:anatomy@mail.ru)

Целью проведенного исследования явилось изучение морфофункционального состояния печени под влиянием синтетического аналога АКТГ – семакса (АКТГ-<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro) в условиях острого иммобилизационного стресса. Пептид вводили внутривенно крысам-самцам Вистар в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг за 15 минут до начала стрессорного воздействия в виде 4-часовой иммобилизации. Биохимическими и морфометрическими исследованиями установлено, что острый иммобилизационный стресс вызывает снижение концентрации общего белка и увеличение концентрации аминотрансфераз в крови и развитие гидрической дистрофии печени. Введение пептида в дозах 5, 50, 150 мкг/кг снижает выраженность дистрофии с сохранением её незначительных проявлений в промежуточных отделах печеночных долек. Увеличение дозы пептида до 450 мкг/кг сопровождается остаточными признаками дистрофии преимущественно в центральных отделах долек. Также препарат вызывает разнонаправленные изменения активности аминотрансфераз. В дозах 5 и 50 мкг/кг препарат снижает активность АлАТ, тогда как в дозе 450 мкг/кг повышает её. В дозе 5 мкг/кг семакс ведет к увеличению активности АсАТ.

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

## INFLUENCE OF ACTH-<sub>4-7</sub>-PRO-GLY-PRO INTRAPERITONEAL INJECTION ON HEPATOCYTE MORPHO-FUNCTIONAL STATE UNDER ACUTE IMMOBILIZATION STRESS

*Ivanov A.V.<sup>1</sup>, Bobytsev I.I.<sup>2</sup>, Shepeleva O.M.<sup>3</sup>, Kryukov A.A.<sup>2</sup>, Myasoedov N.F.<sup>4</sup>, Andreeva L.A.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> Department of Histology, Embryology, Cytology, <sup>2</sup> Department of Pathophysiology, <sup>3</sup> Department of General Hygiene of Kursk State Medical University, Kursk; <sup>4</sup> Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow

The aim of this study was to investigate the influence of semax, a synthetic analogue of ACTH (ACTH-<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro), on the morpho-functional condition of liver under chronic immobilization stress. The peptide was administered by intraperitoneal injection to male Wistar rats at doses of 5, 50, 150, and 450 mcg/kg of body weight, 15 minutes before exposure to stress. Stress was performed by 4 h immobilization. Biochemical and morphometric examination showed that stress exposure significantly decreased the serum protein concentration, increased the activity of serum ALT and AST, and induced liver hydropic degeneration in the control group. Application of the peptide at the dose of 5, 50, and 150 mcg/kg resulted in improvement of the hepatocytes condition in central and peripheral parts of the lobules, but residual portions of hydropic degeneration remained in the intermediate sections. The further increase in the peptide dose up to 450 mcg/kg was characterized by residual hydropic degeneration in the central sections of liver lobules. Beside the manifestations mentioned, the peptide at the dose of 5 and 50 mcg/kg decreased the ALT activity, but increased it at the dose of 450 mcg/kg. The AST activity was reliably increased at the dose of 5 mcg/kg.

**Keywords:** hepatocytes, stress, analogue of ACTH-<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro, semax, liver.

В настоящее время известно, что результатом стрессорного воздействия на организм могут являться патологические изменения печени различного характера [10], важным патогенетическим механизмом которых выступают нарушения микроциркуляции с последующей гипоксией тканей [7], прооксидантно-антиоксидантный дисбаланс клеток с развитием перекисного окисления липидов клеточных мембран [13].

Установлено, что острый гипокинетический стресс вызывал увеличение концентрации аминотрансфераз при сохранности гистологической картины гепатоцитов [6, 14]. Также известно, что при гипокинезии

наблюдались изменения структуры гепатоцитов в виде расширения и фрагментации эндоплазматической сети, митохондрий, увеличения числа цитоллизосом [12], которые были отмечены и на фоне отсутствия достоверных различий в концентрации аминотрансфераз в сыворотке крови [11]. Причинами данных изменений могут быть известные катаболические эффекты глюкокортикоидов, способные прямо или опосредованно оказывать влияние на морфологию и функциональную активность гепатоцитов. Учитывая ключевую роль печени в синтезе белков плазмы крови, в поддержании гомеостаза организма в целом, её повреждения, в

том числе стрессорного генеза, могут иметь серьёзные последствия для организма. В связи с этим представляет особый интерес поиск стресспротективных препаратов, не обладающих гепатотоксическими эффектами. В числе таких препаратов можно рассматривать синтетические аналоги природных регуляторных пептидов, обладающих широким спектром биологических эффектов [3]. В частности, в настоящее время в клинической практике широко используется синтетический аналог фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub> в виде фармакологического препарата семакс [4]. В ряде экспериментальных исследований препарат уменьшал стресс-индуцированные нарушения микроциркуляции в брыжейке [2], усиливал устойчивость эритроцитов [1], влиял на противосвёртывающую систему и обладал антиагрегационным действием [5]. Однако данных о влиянии семакса на состояние гепатоцитов в условиях стресса нами не обнаружено.

Принимая во внимание вышеперечисленные качества пептида, представлялось целесообразным исследование его влияния на вызванные стрессом изменения в печени. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение эффектов семакса на состояние паренхимы печени в условиях острого иммобилизационного стресса.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на 60 крысах-самцах Вистар массой 220-250 г, распределённых на группы по 10 животных, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и контролируемой температуре ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Все исследования проводились 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 (АКТГ<sub>-4-7-Pro-Gly-Pro</sub>), синтезированный в Институте молекулярной генетики РАН. Пептид растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно за 15 мин до начала стрессорного воздействия в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объёмы физиологического раствора из расчёта 1 мл на 1 кг массы тела.

Острый иммобилизационный стресс (ОИС) моделировали путём помещения животных в тесные индивидуальные пластиковые боксы,

соответствующие размерам животного. Продолжительность иммобилизации составляла однократно 4 часа. По окончании стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента путём забора крови из правого желудочка сердца под эфирным наркозом.

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

Содержание в сыворотке крови аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и общего белка определяли на автоматическом биохимическом анализаторе «Vitalit 1000» (Италия) с использованием реактивов «Витал» (Россия).

Состояние гепатоцитов и оценку распределения поражений в печёночной дольке, а также реакцию вилочковой железы на стресс оценивали по микрофотографиям парафиновых срезов толщиной 5-7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Микрофотографирование осуществляли с помощью оптической системы Leica CME и окуляр-камеры DCM-510. Морфометрию проводили с помощью пакета программ ImageJ. Определяли количество одно- и двуядерных, одно- и многоядрышковых гепатоцитов в центральном и периферическом отделах печёночных долек. Проводили сравнение степени выраженности очаговой делимфатизации тимуса между контрольной и экспериментальными группами с целью подтверждения эффекта модели стресса и стресс-протекторного эффекта различных доз семакса.

Полученные цифровые данные обрабатывали по следующему алгоритму: вначале определяли показатели описательной статистики, после чего удаляли наблюдения, в которых значения выходили за пределы интервала  $M \pm 2\sigma$ ; затем повторно определяли показатели описательной статистики (значения среднего арифметического, среднего квадратического отклонения, медианы, моды, эксцесса и скоса) и на их основе – тип распределения данных. Достоверность полученных результатов определяли по t-критерию Стьюдента и критерию Манна-Уитни.

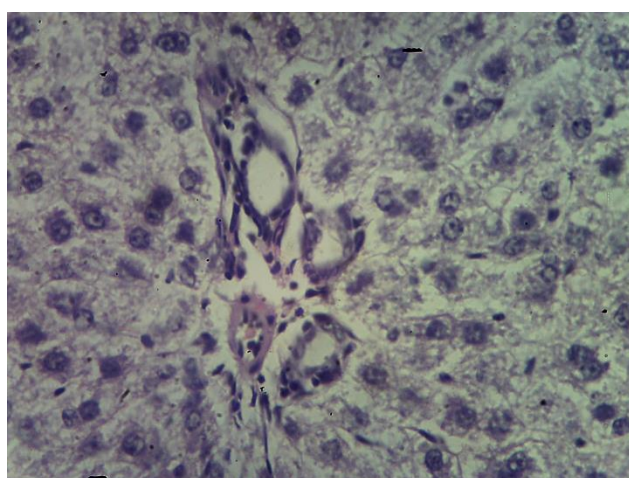
#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что после моделирования ОИС происходит снижение массы печени (табл. 1) по сравнению с интактными животными на фоне небольшого снижения массы тимуса, в корковом веществе которого отмечают многочисленные очаги делимфатизации.

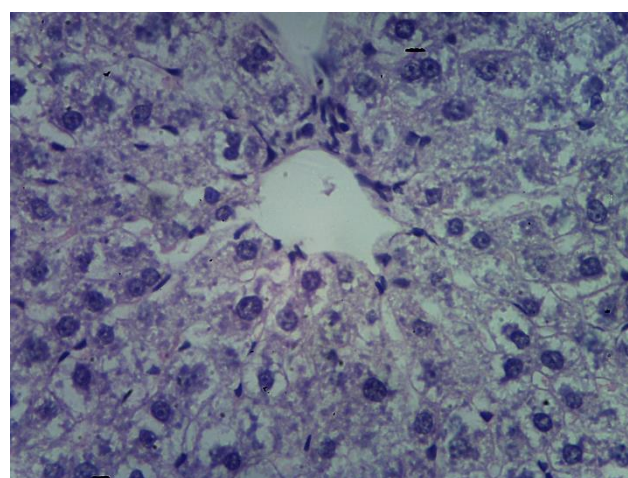
Эффекты АКТГ-4,7-Pro-Gly-Pro в условиях ОИС ( $M \pm m$ )

Показатель \ Группа	Контроль без стресса	Стрессированные животные				
		Контроль	введение АКТГ-4,7-Pro-Gly-Pro в дозе (мкг/кг)			
			5	50	150	450
Массовый индекс печени	40,5±1,68	35,9±1,28*	28,0±0,72 <sup>1</sup>	29,3±1,00 <sup>1</sup>	34,4±0,90	31,4±1,07 <sup>1</sup>
Массовый индекс тимуса	1,7±0,11	1,5±0,08	1,6±0,09	1,9±0,11 <sup>1</sup>	1,7±0,06	1,7±0,13
Общий белок, г/л	68,7±1,19	63,6±1,32*	64,9±0,80	61,9±0,86	65,7±1,58	64,7±1,57
АсАТ, ед/л	115,4±9,16	198,0±12,61*	249,3±22,59 <sup>1</sup>	203,2±19,99	199,5±18,18	232,3±22,95
АлАТ, ед/л	42,9±4,35	60,5±3,67*	46,8±2,72 <sup>1</sup>	44,9±3,18 <sup>1</sup>	58,3±4,65	72,3±7,92 <sup>1</sup>
Коэффициент де Ритиса	2,69	3,27	5,32	4,53	3,42	3,21

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



А



Б

Рис. 1. Состояние гепатоцитов в периферическом (А) и центральном (Б) отделах печёночной дольки крыс после моделирования ОИС на фоне введения физраствора. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.  $\times 100$ .

В паренхиме печени обнаруживаются признаки белковой дистрофии по типу её гидропической разновидности. В цитоплазме клеток видны разнокалиберные вакуоли. Наиболее повреждёнными оказываются клетки периферического отдела дольки (рис. 1А), где помимо массовой мелко- и среднекапельной гидропической дистрофии обнаруживаются клетки в состоянии фокального гидропического некроза.

Указанные морфологические изменения сопровождаются сдвигами ряда биохимических показателей крови. В остром эксперименте у животных обнаружено статистически достоверное снижение концентрации общего белка крови на 6,1%. Развитие стресса также подтверждает увеличение концентрации АлАТ и АсАТ до значений в 1,41-1,72 раза выше по сравнению с интактными животными (табл. 1). Значения коэффициента де Ритиса (АсАТ/АлАТ) достигают значений 3,27.

При введении животным АКТГ-4,7-Pro-Gly-Pro во всех используемых дозах на фоне ОИС обнаружена очаговая делимфатизация коры тимуса в различной степени выраженности. Однако на этом фоне наблюдается восстановление его массы до уровня интактных животных (табл. 1).

Морфологическая картина изменения печени при введении АКТГ-4,7-Pro-Gly-Pro на фоне ОИС характеризуется снижением выраженности проявлений дистрофии. Так, на дозах 5, 50 и 150 мг/кг незначительное количество мелких вакуолей обнаруживается в гепатоцитах только промежуточного отдела печёночных долек, в то время как в центральном и периферическом отделах отмечается лишь некоторое расширение синусоидных капилляров (рис. 2 А, Б, В, Г, Д, Е). Увеличение дозы до 450 мг/кг (рис. 2Ж, 3) сопровождается остаточными явлениями белковой дистрофии в виде зернистости цитоплазмы, преимущественно в центральном отделе дольки.

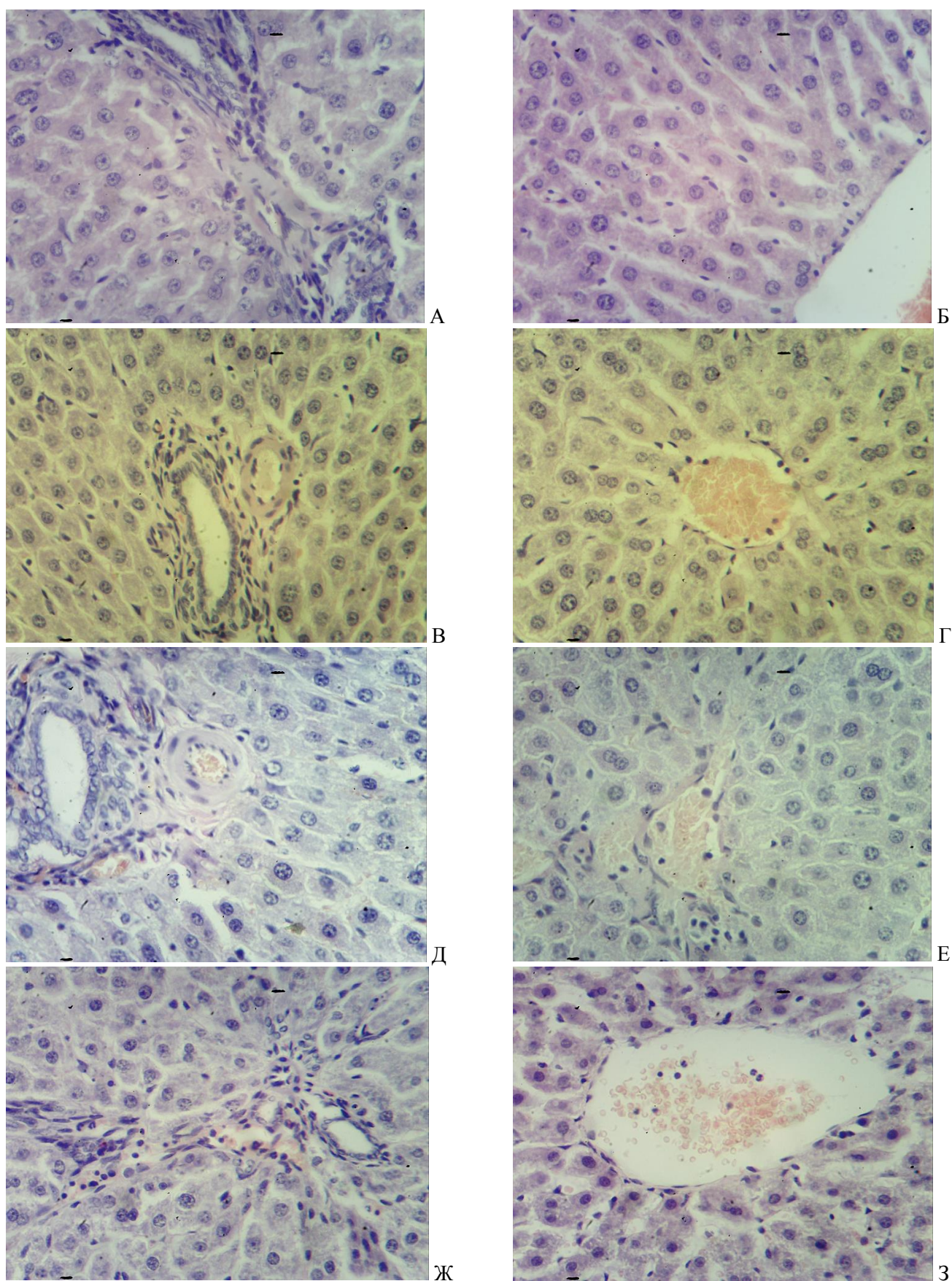


Рис. 2. Состояние гепатоцитов в периферическом (А, В, Д, Ж) и центральном (Б, Г, Е, З) отделах печёночной дольки крыс после моделирования ОИС фоне введения АКТГ-4-7-Pro-Gly-Pro в дозах 5 (А, Б), 50 (В, Г), 150 (Д, Е) и 450 (Ж, З) мг/кг. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100.

Масса органа при этом не изменяется по сравнению с контрольными стрессированными животными (табл. 1). Также отсутствуют статистически значимые изменения концентрации общего белка в плазме крови (табл. 1).

Концентрация АсАТ на дозах 50 и 150 мг/кг практически не отличается от показателей контрольной группы животных, в то время как концентрация АлАТ на дозах 5 и 50 мг/кг даже снижается до значений интактной группы. При этом индекс де Ритиса составляет 5,32 – 4,53 – 3,42 – 3,21 соответственно увеличению дозы пептида. Следует отметить, что линейное уменьшение его значений вызвано ростом абсолютных значений концентрации АлАТ на дозах 150 и 450 мг/кг, что свидетельствует об утяжелении состояния печени.

Подсчёт относительного количества одно- и многоядрышковых а также одно- и многоядерных гепатоцитов в центральном (рис. 3) и периферическом (рис. 4) отделах долек показал, что при моделировании ОИС в центральном отделе дольки отмечается увеличение количества многоядрышковых клеток ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 3А) на фоне незначительного увеличения относительного количества многоядерных гепатоцитов (рис. 3Б). При этом в периферическом отделе дольки количество многоядрышковых клеток достоверно снижено ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 4А), а многоядерных клеток несущественно превышает значения интактных животных (рис. 4Б).

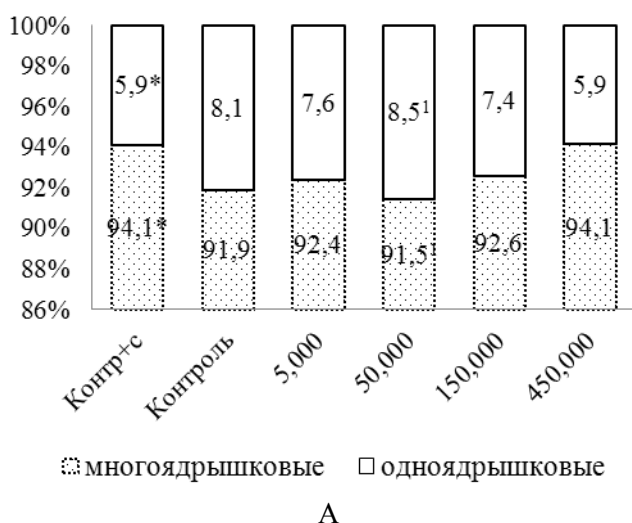


Рис. 3. Гистограмма соотношения одно- и многоядрышковых гепатоцитов (А), одно- и многоядерных гепатоцитов (Б) в центральном отделе печёночной дольки крыс после моделирования ОИС фоне введения АКТГ<sub>-4,7</sub>-Pro-Gly-Pro в дозах 5, 50, 150 и 450 мг/кг; \* –  $p \leq 0,05-0,001$  по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу; <sup>1</sup> –  $p \leq 0,05-0,001$  по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу.

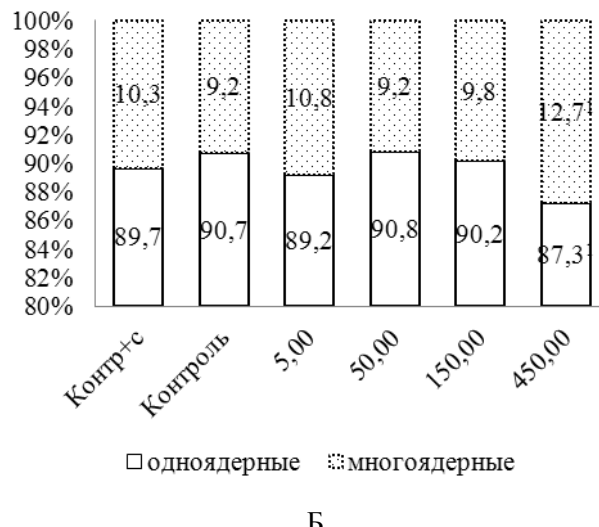
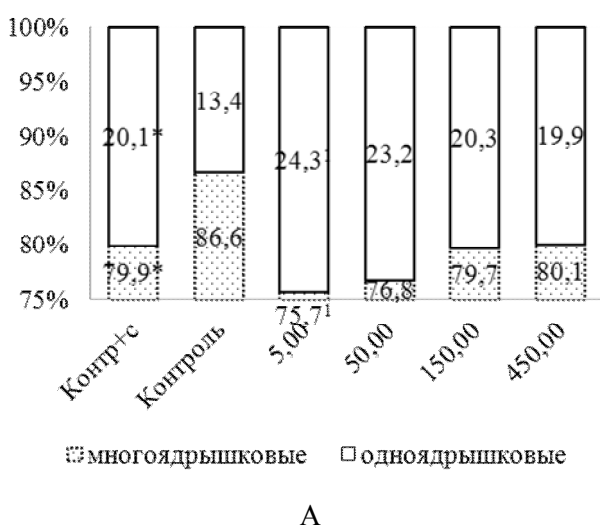


Рис. 4. Гистограмма соотношения одно- и многоядрышковых гепатоцитов (А), одно- и многоядерных гепатоцитов (Б) в периферическом отделе печёночной дольки крыс после моделирования ОИС фоне введения АКТГ<sub>-4,7</sub>-Pro-Gly-Pro в дозах 5, 50, 150 и 450 мг/кг.

Введение АКТГ<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro в дозах 5-150 мг/кг на фоне ОИС приводит к относительному уменьшению количества многоядрышковых гепатоцитов в центральном отделе дольки до значений в группе интактных животных (рис. 3А). В периферическом отделе доза пептида 5 мкг/кг вызывает значимое снижение относительного количества многоядрышковых клеток ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 4А), а доза 450 мг/кг вызывает некоторое увеличение ( $p \leq 0,01$ ) относительного количества многоядерных клеток (рис. 4Б).

Таким образом, однократная четырёхчасовая иммобилизация животных индуцирует развитие стрессовой реакции, что подтверждается увеличением концентрации и соотношения концентрации аминотрансфераз в плазме крови. Наличие стрессовой реакции также подтверждается развитием реактивных (обратимых) изменений вилочковой железы в виде очаговой делимфатизации. При этом в печени наблюдается развитие гидропической дистрофии, выраженность признаков которой убывает в направлении от периферии дольки к её центральному отделу. В развитии указанной патологии определённую роль могла сыграть реакция надпочечников в виде выброса глюкокортикоидов, обладающих, как известно, катаболическим эффектом.

Резкое изменение белкового спектра плазмы крови не может не отразиться на синтетической функции гепатоцитов. Косвенным доказательством этого предположения могут являться обнаруженные нами колебания концентрации общего белка в плазме крови. А достоверным доказательством изменения синтетической функции органа следует считать относительное увеличение количества многоядерных и многоядрышковых гепатоцитов в центральном отделе дольки при моделировании ОИС по сравнению с периферическим отделом.

В отношении выраженности стресспротекторного эффекта АКТГ<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro следует отметить, что в условиях ОИС пептид в дозах 5-150 мг/кг способствовал нормализации состояния гепатоцитов в центральных и периферических отделах долек с сохранением резидуальных участков гидропической дистрофии в промежуточных отделах. В основе данных результатов могут находиться несколько механизмов. В частности, согласно данным литературы, семакс может ослаблять выраженность стрессорной реакции в организме за счёт целого ряда эффектов [1-5]. В то же время нельзя исключать и прямого взаимодействия пептида со специфическими меланокортиновыми рецепторами на гепатоцитах. В настоящее время

идентифицировано 5 типов меланокортиновых рецепторов (MC1R – MC5R), к которым АКТГ<sub>4-10</sub> обладает высоким сродством, и установлено их распределение в тканях и клетках [8]. В частности, MC5-рецепторы экспрессируются во многих органах, в том числе и в печени, поэтому семакс может связываться с данными рецепторами и оказывать прямое влияние на состояние гепатоцитов.

Однако для подтверждения данного предположения необходимо проведение дополнительных исследований, в частности, возможной рецепции пептида в гепатоцитах, в том числе *in vitro*.

Таким образом, АКТГ<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro при внутрибрюшинном введении в дозах 5-150 мг/кг ОИС оказывает стресс-лимитирующее гепатопротекторное действие, проявляющееся снижением выраженности гидропической дистрофии гепатоцитов, развивающейся при моделировании острого иммобилизационного стресса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Голубева М.Г. Нейропептид семакс изменяет функциональную активность эритроцитов и тромбоцитов при иммобилизационном стрессе // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2010. – № 2 (42). – С. 45-49.
2. Копылова Г.Н., Смирнова Е.А., Санжиева Л.Ц., Умарова Б.А., Лелекова Т.В., Самонина Г.Е. Глипролины и семакс уменьшают стрессогенные нарушения микроциркуляции в брыжейке // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2003. – Т. 136, № 11. – С. 497-499.
3. Королёва С.В., Мясоедов Н.Ф. Динамическая иерархия регуляторных пептидов. Структура индукционных связей регуляторов как мишень для терапевтических воздействий // Усп. физиол. наук. – 2012. – № 43(3). – С. 38-47.
4. Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Виленский Д.А., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Исследование спектра физиологической активности аналога АКТГ(4-10) гептапептида семакс // Нейрохимия. – 2008. – Т. 25, № 1-2. – С. 111-118.
5. Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Оберган Т.Ю. Функциональное состояние противосвёртывающей системы при воздействии на организм регуляторных пептидов Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, семакса и тафцина в соединении с природным гепарином // Нейрохимия. – 2008. – Т. 25, № 1-2. – С. 23-29.
6. Мышкин В.А., Савлуков А.И., Ибатуллина Р.Б., Еникеев Д.А. Коррекция острого иммобилизационного стресс-синдрома сукцинатом оксиметилурацила и мексидолом // Медицинский вестник Башкортостана. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 59-62.

7. *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.
8. *Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M.* Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation // *Pharmacol. Rev.* – 2004. – Vol. 56, N 1. – P. 1-29.
9. *Djordjevic J., Djordjevic A., Adzic M., Niciforovic A., Radojic M.B.* Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats // *Physiol. Res.* – 2010. – Vol. 59. – P. 729-736.
10. *Christiansen J.J., Djurhuus C.B., Gravholt C.H., Iversen P., Christiansen J.S., Schmitz O., Weeke J., Jørgensen J.O., Møller N.* Effects of Cortisol on Carbohydrate, Lipid, and Protein Metabolism: Studies of Acute Cortisol Withdrawal in Adrenocortical Failure // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2007. – Vol. 92, N 9. – P. 3553-3559.
11. *Marjani A., Rahmati R., Mansourian A.R., Veghary G.* Effect of Peppermint Oil on Serum Lipid Peroxidation and Hepatic Enzymes after Immobility Stress in Mice // *Open Biochem. J.* – 2012. – Vol. 6. – P. 51-55.
12. *Salas M., Tuchweber B., Kourounakis P.* Liver ultrastructure during acute stress // *Pathol Res Pract.* – 1980. – Vol. 167. – P. 217-233.
13. *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.
14. *Zhu Q., Gu L., Wang Y., Jia L., Zhao Z., Peng S., Lei L.* Alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in restraint stress-induced liver Injury in Mice // *PLoS ONE.* 2014. – № 9. – P. 921-925.