

© Коллектив авторов, 2017
УДК 611.36:616.8-008.615:615.244:599.323.4

*А.В.Иванов¹, И.И.Бобынцев², О.М.Шепелева³, А.А.Крюков²,
Л.А.Андреева⁴, Н.Ф.Мясоедов⁴*

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ И ИХ ОСОБЕННОСТИ ПРИ ВВЕДЕНИИ СЕМАКСА

¹ Кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — проф. А.В.Иванов); ² кафедра патофизиологии (зав. — проф. И.И.Бобынцев); ³ кафедра общей гигиены (зав. — проф. А.М.Черных), Курский государственный медицинский университет; ⁴ отдел химии физиологически активных веществ (зав. — академик РАН проф. Н.Ф.Мясоедов), Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Целью проведенного исследования явилось изучение изменений паренхимы печени при хроническом иммобилизационном стрессе и влияние на них синтетического аналога аденокортикотропного гормона (АКТГ) — семакса (АКТГ₄₋₇-PGP). Пептид вводили внутривентриально крысам-самцам линии Вистар в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг за 15 мин до начала стрессорного воздействия в виде 2-часовой иммобилизации на протяжении 5 сут. Морфометрическими методами выявлено, что данное стрессорное воздействие индуцирует развитие гидропической дистрофии печени. Введение пептида в дозе 5 мкг/кг не вызывает значимых изменений в постстрессорном состоянии печени. Увеличение дозы до 50 и 150 мкг/кг приводит к улучшению состояния гепатоцитов в центральных и периферических отделах долек с сохранением резидуальных участков гидропической дистрофии в промежуточных отделах. Дальнейшее увеличение дозы пептида до 450 мкг/кг не приводит к нормализации структуры паренхимы. Таким образом, внутривентриальное введение семакса в дозах 50 и 150 мкг/кг оказывает стресслимитирующее гепатопротекторное действие в условиях хронического иммобилизационного стресса.

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

Стрессорное воздействие на организм сопровождается различными морфологическими изменениями в печени, в развитии которых наибольшее значение имеет нарушение микроциркуляции и последующие ишемия и гипоксия тканей, а также перекисное окисление липидов клеточных мембран [9, 12, 15]. Морфологические изменения печени при стрессе характеризуются расширением и фрагментацией эндоплазматической сети, укрупнением митохондрий, увеличением числа цитозолом гепатоцитов [13], нарушением пластинчато-радиальной структуры печеночной дольки, расширением сосудистого русла, периваскулярной лейкоцитарной инфильтрацией, очагами некроза и снижением количества многоядерных гепатоцитов [7]. На фоне перечисленных выше изменений отмечалась также вакуолизация гепатоцитов и увеличение количества коллагеновых волокон в строме [14].

Изложенные данные свидетельствуют о необходимости разработки путей коррекции стрессиндуцированных изменений в печени. В поиске стресспротективных препаратов наше внимание было обращено на препарат «Семакс», являющийся

синтетическим аналогом фрагмента АКТГ₄₋₁₀. При экспериментальных стрессорных воздействиях: препарат уменьшал нарушения микроциркуляции [4], проявлял гастропротекторные свойства в условиях стрессового язвообразования [1], активировал противосвертывающую систему и оказывал антиагрегационное действие на тромбоциты [3]. В культуре ткани семакс проявлял антиоксидантное, антигипоксическое, ангиопротекторное и нейротрофическое свойства [6]. Однако данные о влиянии семакса (АКТГ₄₋₇-PGP) на состояние гепатоцитов в литературе отсутствуют. С учетом представленного спектра биологической активности семакса, а также отсутствия токсических эффектов было целесообразно изучить его влияния на стрессиндуцированные изменения печени, что и явилось целью настоящей работы.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 60 крысах-самцах линии Вистар массой 220–250 г, разделенных на следующие группы: 1-ю группу составили крысы, получавшие только изотонический раствор хлорида натрия; 2-ю группу — получавшие раствор хлорида натрия и подвергавшиеся стрессированию; 3-ю группу — получавшие семакс (АКТГ₄₋₇-PGP); 4-ю группу — получавшие семакс и

Сведения об авторах:

Иванов Александр Викторович (e-mail: anatomy@mail.ru), кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, *Бобынцев Игорь Иванович* (e-mail: bobig@mail.ru), *Крюков Алексей Анатольевич*, кафедра патофизиологии, *Шепелева Ольга Михайловна*, кафедра общей гигиены, Курский государственный медицинский университет, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3

Андреева Людмила Александровна (e-mail: landr@img.ras.ru), *Мясоедов Николай Федорович* (e-mail: nfm@img.ras.ru), отдел химии физиологически активных веществ, Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. акад. Курчатова, 2

подвергавшиеся стрессированию. Были исследованы также интактные животные. В каждой группе было по 10 животных, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и контролируемой температуре воздуха (22 ± 2 °C). Все исследования 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 изотоническом растворе хлорида натрия и вводили внутривенно за 15 мин до начала каждого стрессорного воздействия в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг. Животным, получавшим хлорид натрия, вводили его эквивалентные объемы. Материал брали на 5-е сутки от начала исследования.

В работе использована модель хронического иммобилизационного стресса (ХИС), который создавали путём помещения животных в индивидуальные пластиковые боксы, соответствующие размерам животного. Иммобилизацию проводили по 2 ч в течение 5 сут в первой половине дня. По окончании стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента путем взятия крови из правого желудочка сердца под эфирным наркозом.

Определяли индекс массы печени как массу органа/масса животного $\times 1000$. Состояние гепатоцитов и оценку распределения поражений в печеночной дольке оценивали по микрофотографиям парафиновых срезов толщиной 5–7 мкм, окрашенных гематоксилином — эозином. Микрофотографирование препаратов, полученных от всех животных (4 среза от каждого животного, 7–8 микрофотографий с каждого среза), осуществляли с помощью оптической системы Leica CME и окулярной камеры DCM-510 (Leica, Германия). Морфометрическое исследование проводили с помощью пакета программ ImageJ. Определяли количество и относительное содержание одно- и двуядерных, одно- и многоядрышковых гепатоцитов в центральном и периферическом отделах печеночных долек.

Значимости различий судили по t-критерию Стьюдента и критерию Манна—Уитни.

Результаты исследования. Обнаружено, что после моделирования ХИС происходит снижение массы печени по сравнению с таковой у интактных животных. Так, индекс массы печени у контрольных нестрессированных крыс составлял $40,5 \pm 1,7$ мкг/кг, тогда как в контрольной группе стрессированных животных данный показатель был снижен на 35% ($P \leq 0,05$) до $26,5 \pm 0,9$ мкг/кг. При введении пептида в дозе 50 мкг/кг происходило увеличение индекса массы до $29,4 \pm 0,8$ мкг/кг (на 11%, $P \leq 0,05$). При введении других доз пептида существенных изменений данного показателя не наблюдалось.

В паренхиме печени были обнаружены признаки белковой дистрофии по типу её гидропической разновидности: в цитоплазме гепатоцитов были видны разной величины вакуоли, скопление гранул в цитоплазме, преимущественно на ее периферии. Выраженность признаков дистрофии

нарастала в направлении от периферии дольки к ее центральному отделу.

Морфологические изменения печени при введении семакса на фоне ХИС характеризовались снижением выраженности проявлений белковой дистрофии при дозах 50 и 150 мкг/кг. Было обнаружено незначительное количество мелких вакуолей и зернистость цитоплазмы гепатоцитов в периферических отделах печеночных долек, незначительное расширение синусоидных капилляров и умеренное содержание гистиоцитов вокруг элементов триад (рисунок, а, б).

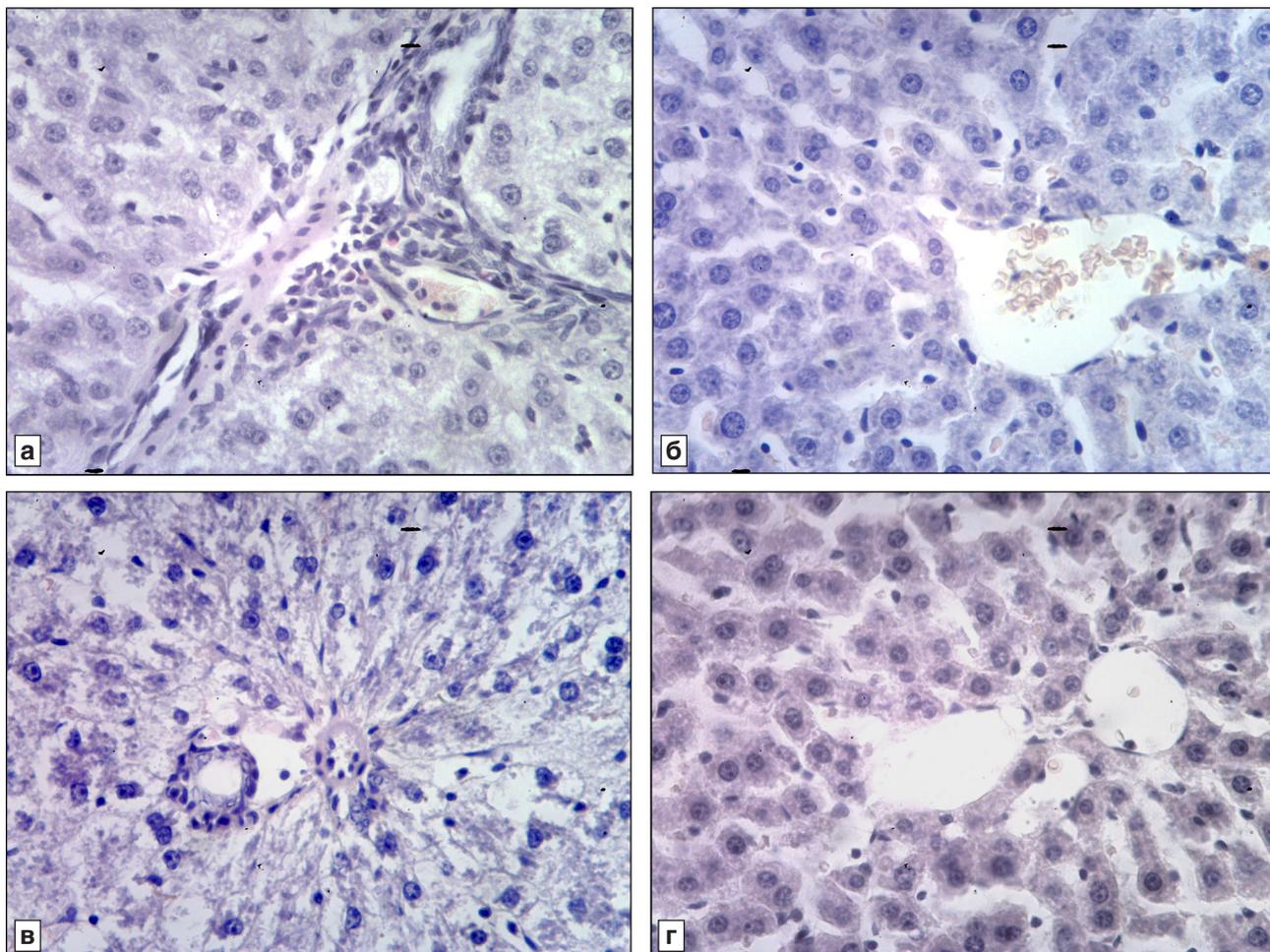
При увеличении дозы пептида до 450 мкг/кг (см. рисунок, в, г) не приводит к нормализации структуры паренхимы печени. Обнаруживались многочисленные деформированные гепатоциты с крупными вакуолями в цитоплазме, скоплениями гранул. Пластинки гепатоцитов выглядели деформированными вследствие гибели части клеток. Отмечались гепатоциты в стадии гидропического некроза. Выраженность указанных признаков была выше в периферическом отделе дольки.

Определение относительного содержания одно- и многоядрышковых, а также одно- и многоядерных гепатоцитов в центральном и периферическом отделах долек показало, что при моделировании ХИС в центральном отделе дольки стресс не вызывает изменения соотношения исследуемых видов гепатоцитов (таблица). В периферическом отделе дольки количество многоядрышковых клеток было существенно снижено — на 14,4%, ($P \leq 0,001$).

Введение семакса в дозах 50–450 мкг/кг на фоне ХИС приводило к снижению доли многоядрышковых гепатоцитов лишь в центральном отделе дольки при дозе в 150 мкг/кг. Это происходило на фоне линейного, дозозависимого снижения относительного количества многоядерных гепатоцитов в центральном отделе. Статистически значимыми эти изменения становились лишь при дозе 450 мкг/кг, когда было обнаружено уменьшение значения этого показателя на 13,0% ($P \leq 0,05$) при сравнении с показателями у животных стрессированной контрольной группы.

На периферии печеночных долек введение семакса в дозах 50 и 450 мкг/кг вызывало увеличение количества многоядрышковых гепатоцитов по сравнению с таковым у стрессированных контрольных крыс на 7,9 ($P \leq 0,001$) и 5,0% ($P \leq 0,05$) соответственно, но восстановления относительного содержания многоядерных гепатоцитов не происходило.

Обсуждение полученных данных. Установлено, что 5-кратное 2-часовое пребывание лабораторных животных в условиях иммобили-



Гепатоциты в периферическом (а, в) и центральном (б, г) отделах печёночной дольки у крыс после моделирования хронического иммобилизационного стресса при введении семакса (АКТГ₄₋₇-PGP) в дозах, 50 (а), 150 (б) и 450 (в, г) мкг/кг.

Гематоксилин—эозин. Ув. 100

Характеристика гепатоцитов при введении крысам семакса (АКТГ₄₋₇-PGP) ($\bar{x} \pm \sigma$)

Отделы дольки печени	Гепатоциты	Контрольная без стресса	Группы стрессированных животных				
			Контрольная	Дозы введенного семакса, мкг/кг			
				5	50	150	450
Центральный	Одноядерные	84,0±1,0	86,4±0,6*	85,6±0,6	86,0±0,8	86,6±0,6	88,2±0,6**
	Многоядерные	6,0±1,0	13,6±0,6*	14,4±0,6	4,0±0,8	13,4±0,6	11,8±0,6**
	Одноядрышковые	7,9±0,8	7,2±0,4	7,4±0,5	8,1±0,6	10,5±0,6**	8,8±0,6**
	Многоядрышковые	92,1±0,8	92,8±0,4	92,6±0,5	2,0±0,6	89,5±0,6**	91,2±0,6**
Периферический	Одноядерные	91,2±0,7	92,9±0,5*	94,3±0,4**	92,6±0,8	92,9±0,6	93,8±0,6
	Многоядерные	8,8±0,7	7,1±0,5*	5,7±0,4**	7,4±0,8	7,1±0,6	6,2±0,6
	Одноядрышковые	13,2±1,0	25,2±1,2*	24,9±1,7	19,3±1,3**	23,1±1,1	21,4±1,2**
	Многоядрышковые	86,8±1,0	74,8±1,2*	75,1±1,7	80,7±1,3**	77,0±1,1	78,6±1,2**

* Различия значимы при $P \leq 0,05-0,001$ по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу;

** $P \leq 0,05-0,001$ по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу.

зации сопровождалось развитием гидропической дистрофии гепатоцитов. Можно полагать, что определённую роль в развитии гидропической дистрофии могла сыграть реакция надпочечников

в виде выброса глюкокортикоидов, обладающих катаболическим свойством.

Отсутствие динамики в соотношении одно- и многоядрышковых, а также одно- и многоядер-

ных гепатоцитов в центральных отделах долек и снижение относительного содержания многоядерных клеток в периферических отделах долек при моделировании ХИС может быть объяснено относительно небольшой продолжительностью стрессового воздействия во время сеанса и адаптацией животных к стрессу.

Для стресслимитирующего эффекта семакса характерна некоторая дозозависимость. Так, в дозах 50 и 150 мкг/кг этот пептид приводит к восстановлению состояния гепатоцитов в центральных и периферических отделах долек с сохранением резидуальных участков гидропической дистрофии в промежуточных отделах. Однако наибольшая из использованных доз — 450 мкг/кг таких эффектов не вызывала.

Полученные результаты в своей основе могут иметь следующие объяснения. Известно, что пептид в аналогичном диапазоне доз при внутрибрюшинном введении у крыс давал анксиолитический, антидепрессантный и нейропротекторный эффект [5], что могло оказать существенное влияние на развитие стрессорной реакции за счет ослабления ее центральных механизмов. Наряду с этим возможны не только центральные механизмы установленных эффектов пептида, но и периферические. В настоящее время идентифицировано 5 типов рецепторов меланокортина (МС1R — МС5R), к которым АКТГ₄₋₁₀ обладает высоким сродством, и установлено их распределение в тканях и клетках. МС5-рецепторы экспрессируются во многих органах, в том числе и в печени [9], поэтому семакс может связываться с данными рецепторами и оказывать прямое влияние на состояние гепатоцитов.

Отмеченная зависимость эффектов семакса от использованной дозы может быть обусловлена следующими механизмами. Известно, что трансмембранная передача сигнала меланокортиновых пептидов с одного и того же рецептора в зависимости от концентрации лиганда осуществляется за счет активации циклического аденозинмонофосфата или инозитолфосфатной системы [10]. Данный механизм установлен для МС3-рецепторов и может обуславливать различия в направленности эффектов пептидов в зависимости от использованной дозы с учетом степени структурно-функционального сходства различных типов меланокортиновых рецепторов [8].

Данные настоящей работы согласуются с результатами, полученными ранее при исследовании влияния семакса на процессы перекисного окисления липидов в гомогенате ткани печени и активности сывороточных трансаминаз на аналогичной модели стресса у крыс [2]. В частно-

сти, семакс в тех же дозах при внутрибрюшинном введении ингибировал процессы перекисного окисления липидов в гепатоцитах крыс. Однако при введении пептида в дозе 450 мкг/кг одновременно увеличивалась активность аланинамино- и аспаргатаминотрансферазы. Это сочетание могло препятствовать отсутствию стресспротективных гепатотропных эффектов при использовании данной дозы семакса. Отмеченное влияние пептида на перекисное окисление липидов, активность сывороточных трансаминаз и развивающиеся на этом фоне структурные изменения в печени могут быть связаны с возможностью взаимодействия пептида с различными типами рецепторов. В частности, активация МС4-рецепторов в миндалевидном теле вызывает стресс-подобные анксиогенные изменения и активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [11].

Таким образом, внутрибрюшинное введение семакса в дозах 50 и 150 мкг/кг оказывает стресслимитирующее гепатопротекторное действие в виде снижения выраженности гидропической дистрофии гепатоцитов, развивающейся в условиях ХИС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакаева З.В., Багликова К.Е., Климова П.А. и др. Сопоставление гастропротекторных свойств семакса и его метаболитов // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16, Биология. 2009. № 4. С. 3–7.
2. Бобынцев И.И., Крюков А.А., Шепелева О.М., Иванов А.В. Влияние пептида АКТГ-4–7-ППГ на перекисное окисление липидов в печени крыс и активность сывороточных трансаминаз в условиях иммобилизационного стресса // Экспер. и клин. фармакол. 2015. Т. 78, № 8. С. 18–21.
3. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. Противосвертывающие и антитромбоцитарные эффекты препарата «семакс» в условиях острого и хронического иммобилизационного стресса // Бюл. exper. биол. 2010. Т. 149, № 1. С. 49–52.
4. Копылова Г.Н., Смирнова Е.А., Санжиева Л.Ц. и др. Глипролины и семакс уменьшают стрессогенные нарушения микроциркуляции в брыжейке // Бюл. exper. биол. 2003. Т. 136, № 11. С. 497–499.
5. Манченко Д.М., Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г. Ноотропные и анальгетические эффекты семакса при различных способах введения // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2010. Т. 96, № 10. С. 1014–1023.
6. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Олгаева А.В., Каменский А.А. Влияние пептида семакса на индуцированное УФ-излучением повреждение плазматических мембран перитонеальных макрофагов мышей // Вестн. МГУ. 2007. № 3. С. 51–54.
7. Удвал Х., Васильева Л.С., Выборова И.С. Структура печени при стрессе и введении арабиногалактана // Сиб. мед. журн. 2004. Т. 48, № 7. С. 22–23.
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, № 1. P. 1–29.

9. Djordjevic J., Djordjevic A., Adzic M. et al. Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats // *Physiol. Res.* 2010. Vol. 59, № 5. P. 729–736.
10. Konda Y., Gantz I., DelValle J. et al. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 18. P. 13162–13166.
11. Liu J., Garza J. C., Li W., Lu X. Y. Melanocortin-4 receptor in the medial amygdala regulates emotional stress-induced anxiety-like behaviour, anorexia and corticosterone secretion // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2013. Vol. 16, № 1. P. 105–120.
12. Nayanatara A. K., Tripathi Y., Nagaraja H. S. et al. Effect of chronic immobilization stress on some selected physiological and Lipid parameters in Wistar Albino Rats // *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2000. Vol. 3, № 1. P. 34–42.
13. Salas M., Tuchweber B., Kourounakis P. Liver ultrastructure during acute stress // *Pathol. Res. Pract.* 1980. Vol. 167, № 2/4. P. 217–233.
14. Salem M. A. R. Effect of «Ginseng» administration on the structural and ultrastructural changes produced by restraint stress in the liver cells of albino rats // *Egypt. J. Hospital Med.* 2001. Vol. 3. P. 1–13.
15. 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, № 28. P. 4850–4860.

Поступила в редакцию 17.02.2016
Получена после доработки 09.01.2017

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER OF RATS EXPOSED TO STRESS AND THEIR PECULIARITIES AFTER ADMINISTRATION OF SEMAX

*A. V. Ivanov¹, I. I. Bobyntsev², O. M. Shepeleva³,
A. A. Kryukov², L. A. Andreyeva⁴, N. F. Myasoyedov⁴*

The aim of the study was to investigate the influence of Semax, a synthetic ACTH analogue (ACTH₄₋₇), on the liver parenchyma in chronic immobilization stress. The peptide was administered by intraperitoneal injection to male Wistar rats at doses of 5, 50, 150 and 450 µg/kg body weight 15 min before exposure to stress in the form of 2 hour-long immobilization during 5 days. Morphometric examination showed that this stress exposure induced the development of liver hydropic dystrophy. Injection of the peptide at the dose of 5 µg/kg produced no significant changes in the liver poststress state. Increase of the dose to 50 and 150 µg/kg resulted in the improvement of hepatocyte state in the central and peripheral regions of the lobules, with the persistence of residual areas of hydropic dystrophy in the intermediate region. Further increase of the peptide dose to 450 µg/kg did not lead to normalization of the parenchyma structure. Thus, under the conditions of chronic immobilization stress, intraperitoneal administration of Semax at the doses of 50 and 150 µg/kg demonstrated a stress-limiting hepatoprotective effect.

Key words: *liver, hepatocytes, stress, ACTH analogue, Semax*

¹ Department of Histology, Embryology, Cytology,
² Department of Pathophysiology, ³ Department of General Hygiene, Kursk State Medical University; ⁴ Department of Chemistry of Physiologically Active Substances, RAS Institute of Molecular Genetics, Moscow