

На правах рукописи



Пинаева Ольга Геннадьевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ
БЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ АНТЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ,
И КОРРЕКЦИЯ ВОЗНИКАЮЩИХ НАРУШЕНИЙ
АНАЛОГАМИ ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Благовещенск – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент Сазонова Елена Николаевна.

Официальные оппоненты:

Меньщикова Елена Брониславовна, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов.

Надеев Александр Петрович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой патологической анатомии.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита состоится «16 мая» 2018 года в 13:00 часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.199.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» и федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 675006, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, д. 95

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», <https://cfpd.amursu.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 года

Ученый секретарь
диссертационного совета



Приходько Анна Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Кислородная недостаточность является основным повреждающим фактором в системе «мать-плацента-плод» (Мешкова Е.М. и соавт., 2014). Большинство осложнений беременности ассоциировано с гипоксией плода (Евсеенко Д.А., Ещенко Ю.В., 2002). Частота гипоксии плода и асфиксии в родах, по данным разных авторов, составляет от 4% (Никольская Л.А., 1999) до 46,6% (Шарапова О.В., 2003). Антенатальная гипоксия (АНГ) и асфиксия при рождении занимают первое место в структуре причин перинатальной смертности (Стародубов В.И. и соавт., 2012; Фролова О.Г. и соавт., 2012). АНГ в анамнезе осложняет течение постнатальной адаптации новорожденного ребенка (Евсеенко Д.А., Ещенко Ю.В., 2002; Malhotra A. et al., 2017; Wang K.C. et al., 2017).

Печень обладает высокой чувствительностью к недостатку кислорода, уступая в этом отношении лишь головному мозгу (Подымова С.Д., 2005). Гипоксия плода приводит к повреждению печени (Надеев А.П. и соавт., 2014; Hannam S. et al., 2003). Хроническая АНГ является фактором риска длительной гипербилирубинемии (Мехрякова И.А., 2008) и коагулопатии новорожденных (Балдина Н.Ю., Спичак И.И., 2014; Hannam S et al., 2003).

Последствия АНГ могут иметь место не только в перинатальном периоде, но и в более поздние сроки онтогенеза млекопитающих (Кельмансон И.А., 1999; Маслова М.В. и соавт., 2001; Li G et al., 2003; Kappeler L. et al., 2017; Wang K.C. et al., 2017). Это соответствует концепции «фетального программирования» (Hales C. N., Barker D. J., 1992). У детей, перенесших АНГ, в препубертатном и пубертатном возрасте нередко диагностируется неалкогольный гепатоз (Бокова Т. А., Урсова Н. И. 2011; Fu J. F. et al., 2011; Gupta R., 2011). Дети с перенесенной перинатальной гипоксией подлежат диспансерному учету как больные с функциональными нарушениями гепатобилиарной системы (Вахитова Л.Ф., 2004; Бережанская С.Б. и соавт., 2013).

Вместе с тем, связь отдаленных структурно-функциональных нарушений печени и окислительного стресса, обусловленного АНГ, изучена недостаточно. Данные о возможных путях коррекции патологии печени, связанной с АНГ, немногочисленны (Wesolowski S.R. et. al., 2017). Сведения о возможности использования биологически активных пептидов в постнатальной коррекции патологии печени после АНГ носят единичный и несистематизированный характер.

В связи с этим, **целью** исследования было изучение морфофункционального состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, а также возможность коррекции постгипоксических нарушений аналогами лей-энкефалина.

Задачи исследования:

1. Изучить ДНК-синтетическую активность, количество ядрышек гепатоцитов и показатели свободнорадикального окисления гомогенатов печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.
2. Изучить цитокариометрические параметры гепатоцитов, показатели свободнорадикального окисления и биохимические маркеры повреждения печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.
3. Исследовать ДНК-синтетическую активность, количество ядрышек гепатоцитов 7-суточных белых крыс и цитокариометрические параметры гепатоцитов 60-суточных белых крыс, подвергнутых неонатальному введению аналогов лей-энкефалина.
4. Изучить влияние неонатального введения аналогов лей-энкефалина на ДНК-синтетическую активность, количество ядрышек гепатоцитов и показатели свободнорадикального окисления гомогенатов печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.
5. Изучить влияние неонатального введения аналогов лей-энкефалина на цитокариометрические параметры гепатоцитов и показатели свободнорадикального окисления гомогенатов печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.

6. Провести сравнительный анализ эффектов аналогов лей-энкефалина: агониста δ -/ μ -опиатных рецепторов (пептида даларгин) и неопиатного аналога лей-энкефалина (пептида НАЛЭ).

Научная новизна. Впервые изучены отдаленные эффекты гипоксического воздействия в антенатальном периоде на цитокариометрические показатели гепатоцитов и свободнорадикальные процессы в печени половозрелых белых крыс. Выявлено, что у половозрелых животных, перенесших антенатальную гипоксию, имеет место снижение массы печени, уменьшение размеров гепатоцитов и их ядер, снижение количества и размеров ядрышек. Впервые показано, что структурные нарушения в печени половозрелых животных, перенесших антенатальную гипоксию, сопровождаются окислительным стрессом на органном и организменном уровнях.

Впервые изучены эффекты неонатального введения неселективного агониста δ -/ μ -опиатных рецепторов (ОР) даларгина и неопиатного аналога лей-энкефалина пептида НАЛЭ на ДНК-синтетическую активность и количество ядрышек гепатоцитов 7-суточных белых крыс, а также на цитокариометрические параметры гепатоцитов 60-суточных белых крыс.

Впервые проведен анализ гепатопротективного эффекта неонатального введения неселективного агониста δ -/ μ -ОР даларгина и неопиатного аналога лей-энкефалина пептида НАЛЭ у 7- и 60-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию. Показано, что неонатальное введение аналогов лей-энкефалина оказывает корректирующее влияние на пролиферативную и анаболическую активность гепатоцитов, а также свободнорадикальное окисление в ткани печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование проводилось в рамках Государственного задания № 056-00110-16-00 ПР «Роль регуляторных пептидов группы опиоидов в компенсации нарушений структурного гомеостаза организма, индуцированных антенатальным оксидативным стрессом». Полученные экспериментальные данные дополняют

современные представления о патогенезе ранних и отдаленных морфофункциональных нарушений печени у млекопитающих, перенесших антенатальную гипоксию; а также о влиянии биологически активных пептидов на морфофункциональное состояние печени в физиологических условиях и в условиях патологии.

Показана возможность коррекции нарушений ядрышкового аппарата гепатоцитов и процессов свободнорадикального окисления после антенатальной гипоксии с помощью неонатального введения аналогов лей-энкефалина, что может быть использовано при определении показаний к применению лекарственных препаратов, созданных на основе исследованных пептидов.

Дано экспериментальное обоснование перспективности применения фармакологических препаратов на основе неопиатного аналога лей-энкефалина при патологических состояниях новорожденных, индуцированных антенатальной гипоксией.

Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для чтения лекций и проведения практических занятий по дисциплинам «Патологическая физиология», «Общая патология», «Фармакология» в ВУЗах медицинского и биологического направления.

Методология и методы исследования. Для анализа влияния антенатальной гипоксии на структурно-функциональное состояние печени новорожденных и половозрелых белых крыс, а также возможностей коррекции возникающих изменений пептидами даларгин и НАЛЭ, проводили автордиографическое, гистохимическое, морфометрическое исследования гепатоцитов. ДНК-синтетическую активность гепатоцитов изучали методом автордиографии с ^3H -тимидином. Параметры ядрышкового организатора исследовали с помощью морфометрии гистологических и цитологических препаратов, окрашенных по методу AgNOR. Свободнорадикальные процессы в гомогенатах печени и сыворотке крови изучали методом хемилюминесценции. Функциональное состояние печени оценивали с помощью биохимических

показателей сыворотки крови и иммуноферментного анализа активности аргиназы-I. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью программы Statistica 10.0.

Степень достоверности. Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом выполненных исследований с использованием современных методов, сертифицированного оборудования и реактивов. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета современных статистических компьютерных программ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антенатальная гипоксия вызывает снижение ДНК-синтетической активности и угнетение ядрышкового аппарата гепатоцитов на фоне активации свободнорадикальных процессов в печени новорожденных белых крыс.

2. У половозрелых белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, имеют место снижение цитокариометрических параметров гепатоцитов и активация процессов свободнорадикального окисления в ткани печени.

3. Неонатальное введение аналогов лей-энкефалина оказывает корректирующее влияние на пролиферативную и анаболическую активность гепатоцитов, а также свободнорадикальное окисление в ткани печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.

Апробация работы. Материалы исследования были представлены и обсуждены на Межрегиональной научно-практической конференции по лабораторной диагностике (Хабаровск, 2013); на I Межрегиональной научной конференции «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины» (Хабаровск, 2013); на II Межрегиональной научной конференции «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины» (Хабаровск, 2014); на III Межрегиональной научной конференции «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины», посвященной памяти профессора С.С.Тимошина (Хабаровск, 2015); на II Всероссийской научно-практической конференции «Состояние и перспективы медицинской реабилитации» (Санкт-

Петербург, 2016), на VI Ежегодной Международной Научно-Практической Конференции «Актуальные вопросы медицины» (Баку, 2017); на международном симпозиуме «Health Sciences University of Hokkaido Symposium» (Sapporo, 2017), на Дальневосточной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы неонатологии и педиатрии» (Хабаровск, 2017).

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах работы в форме планирования экспериментов (85 %), их непосредственного выполнения (95%), обработки полученных данных (95%), обсуждения результатов (85%), написания статей и тезисов (85%), написание диссертации и автореферата (85%).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них - 4 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, оформлено 1 рационализаторское предложение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 151 страницах, содержит 21 таблицу и 12 рисунков. Список литературы включает 389 источников, в том числе 202 отечественных и 187 иностранных. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных данных, заключения, выводов и списка литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

При постановке опытов руководствовались приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». На проведение экспериментов было получено разрешение этического комитета ГБОУ ВПО ДВГМУ Минздравсоцразвития России.

3-4-х месячных беременных крыс-самок с 14 по 19 сутки гестации помещали в экспериментальную гипобарическую камеру, в которой создавали давление 224 мм.рт.ст., что соответствует парциальному давлению кислорода 42 мм.рт.ст. Ежесуточная экспозиция составляла 4 часа. Исследовали

потомство подопытных крыс-самок, перенесших гипоксическое воздействие. Контролем служило потомство интактных животных. Для изучения возможности коррекции последствий АНГ, потомству с 2 по 6 сутки жизни ежедневно в дозе 100 мкг/кг внутрибрюшинно вводили пептидные аналоги лей-энкефалина: неселективный агонист δ/μ -ОР даларгин [Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg] и неопиатный аналог лей-энкефалина НАЛЭ [Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg] («Алмабион», Россия). Контрольные животные получали эквивалентное количество растворителя – физиологического раствора хлорида натрия. Потомство гипоксированных крыс-самок было разделено на три группы: «Аntenатальная гипоксия» («АНГ»), «Аntenатальная гипоксия+даларгин» (АНГ+даларгин), «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» («АНГ+НАЛЭ»).

Для анализа влияния пептидов на интактном фоне формировали группы «Даларгин» и «НАЛЭ»: животным вводили исследуемые пептиды с 2 по 6 сутки жизни ежедневно в дозе 100 мкг/кг внутрибрюшинно. Потомство гипоксированных и интактных крыс-самок выводили из эксперимента на 7-е и 60-е сутки жизни.

После декапитации у 7- и 60-суточных крыс извлекали печень, у 60-суточных животных также производили забор крови. Фрагменты ткани для исследования выделяли из левой боковой доли печени. Приготовление гистологических препаратов осуществляли по общепринятой методике. Цитологические препараты изолированных гепатоцитов готовили методом щелочной диссоциации (Коган М.Е. и соавт., 1976), а также по собственной методике (рационализаторское предложение № 2780). Для анализа ДНК-синтетической активности гепатоцитов, 7-суточным животным за 1 ч до эвтаназии внутрибрюшинно вводили ^3H -тимидин в дозе 1 мкКи/г массы тела (удельная активность 84 Ки/моль). Приготовление радиоавтографов осуществляли по принятой в лаборатории методике с использованием фотоэмульсии Ilford (Великобритания). ДНК-синтетическую активность оценивали путем подсчета индекса меченых ядер (ИМЯ). Также подсчитывали интенсивность метки (ИМ – среднее количество треков серебра над ядром),

косвенно характеризующую скорость синтеза ДНК.

Ядрышки гепатоцитов изучали на срезах печени и цитологических препаратах, окрашенных по методу AgNOR (Мамаев Н.Н. и соавт., 1989; Коржевский Д.Э., 2010). С помощью компьютерной морфоцитометрии на анализаторе изображения «МЕКОС-Ц» оценивали площадь гепатоцитов, площадь ядер и суммарную площадь ядрышек гепатоцитов. Также оценивали долю двуядерных клеток в популяции гепатоцитов.

Процессы свободнорадикального окисления (СРО) в гомогенатах печени и сыворотке крови исследовали методом хемилюминесценции (ХМЛ). Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER». Сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы "Finlab". Определяли параметры интенсивности спонтанного и активированного свечения (Владимиров Ю.А., 1991; Арутюнян А.В., 2000): Ssp – светосумма за 1 минуту спонтанной ХМЛ, величина которой прямо коррелирует с интенсивностью процессинга свободных радикалов; H1 – максимум амплитуды быстрой вспышки Fe²⁺-индуцированного свечения, свидетельствующий о содержании гидроперекисей липидов; Синд1 – светосумма за 2 минуты Fe²⁺-индуцированной ХМЛ, отражающая скорость образования перекисных радикалов; H2 – максимум амплитуды H₂O₂-индуцированного люминол-зависимого свечения, величина которого обратно коррелирует с перекисной резистентностью субстрата; Синд2 – светосумма за 2 минуты H₂O₂-индуцированной люминол-зависимой ХМЛ, величина которой обратно коррелирует с активностью антиоксидантной системы защиты. Интенсивность ХМЛ, измеренную в милливольтгах, выражали в относительных единицах.

Исследование биохимических показателей сыворотки крови у 60-суточных животных проводили по общепринятым методикам (Меньшиков В.В., 1987) с помощью полуавтоматического анализатора «Виталон-400+» с использованием биохимических наборов «Витал» (Россия). Иммуноферментное исследование активности аргиназы-I проводили твердофазным иммуноферментным методом (набор Rat Arginase-I (ARG 1) ELISA kit).

Результаты выражали в нг/мл.

Статистическая обработка результатов экспериментов произведена с помощью стандартной программы Statistica 10.0. По каждому параметру определяли среднее арифметическое значение показателя и стандартную ошибку средней величины. Для определения и исключения «выскакивающих» вариант в выборке использовали критерий Шовене и правило «трех сигм» (Сепетлиев Д.А., 1968). Для анализа отличий между экспериментальными группами использовали критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манни-Уитни. Различия между сравниваемыми показателями считали достоверными при $p < 0,05$. Всего в работе было использовано 587 животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

АНГ оказывала выраженное повреждающее влияние на печень новорожденных и половозрелых крыс. У 7- и 60-суточных животных, перенесших АНГ, была снижена абсолютная масса печени на 19,2% и 15,4% соответственно. У 60-суточных подопытных животных также была снижена относительная масса печени на 4,7% (таблица 1). Это соответствует данным литературы о наличии структурного дефицита жизненно важных органов у животных, перенесших АНГ (Марковский В.Д. и соавт., 2015; Сазонова Е.Н. и соавт., 2011; Iqbal W., Ciriello J., 2013).

У 7-суточных животных, перенесших АНГ, имело место снижение ИМЯ гепатоцитов в 1,77 раза, что свидетельствует об угнетении процессов синтеза ДНК. Также выявлено уменьшение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов подопытных 7-суточных животных на 10,1%; у 60-суточных животных – на 11,9% (Таблица 1). У 60-суточных подопытных животных было зарегистрировано уменьшение суммарной площади ядрышек на 19,85%. Изменение параметров ядрышкового аппарата свидетельствует о снижении белок-синтетической активности гепатоцитов животных, перенесших АНГ. Морфометрический анализ гепатоцитов 60-суточных животных, перенесших

АНГ, показал уменьшение площади клеток на 20,45% и площади ядер гепатоцитов на 16,13%, по сравнению с контролем (Таблица 1). Показатель доли двуядерных гепатоцитов у 60-суточных животных подопытной группы был на 48,9% выше показателей группы контроля. Это может свидетельствовать о нарушении процесса цитокинеза или о компенсаторной реакции, направленной на сохранение функционирования органа в условиях структурного дефицита (Саркисов Д.С., 1987).

Таблица 1 – Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Показатель	Контроль	Антенатальная гипоксия
7-суточные животные		
Абсолютная масса печени, мг	420,56±20,76	339,78±18,00*
Относительная масса печени, %	2,89±0,11	3,15±0,13
Индекс меченных ³ H-тимидином ядер (ИМЯ), %	2,37±0,44	1,34±0,26*
Интенсивность метки (ИМ)	10,78±0,50	10,39±0,57
Количество ядрышек	2,07±0,04	1,86±0,06*
60-суточные крысы-самцы		
Абсолютная масса печени, мг	5682,86±278,21	4808,42±139,41*
Относительная масса печени, %	3,82±0,07	3,65±0,03*
Площадь гепатоцитов, мкм ²	1394,84±82,41	1109,63±66,70*
Площадь ядер, мкм ²	192,58±13,62	161,51±5,88*
Количество ядрышек	3,27±0,08	2,88±0,13*
Площадь ядрышек, мкм ²	7,42±0,34	5,95±0,29*
Доля 2-ядерных гепатоцитов, %	23,13±1,85	34,44±3,76*

Примечания - * - $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль»

Выявленные структурные изменения у подопытных животных сопровождались окислительным стрессом на органном и системном уровнях. У 7-суточных белых крыс группы «Антенатальная гипоксия» мы зарегистрировали интенсификацию процессов свободнорадикального окисления и ослабление антиоксидантной защиты в гомогенатах печени; у 60-суточных крыс-самцов, перенесших АНГ, – в гомогенатах печени и сыворотке крови (таблица 2).

Анализ биохимических параметров сыворотки крови, характеризующих

функциональное состояние печени, у 60-суточных животных, перенесших АНГ, не выявил изменений. Показатели активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, γ -глутамилтрансферазы, лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы; концентрации общего билирубина и аргиназы-I сыворотки крови не отличались от показателей группы «Контроль».

Таким образом, антенатальная гипоксия вызывает нарушения пролиферативных, анаболических и свободнорадикальных процессов в печени белых крыс, сохраняющиеся, как минимум, до половозрелого возраста.

Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых введению аналогов лей-энкефалина в раннем периоде постнатального онтогенеза

Введение неселективного агониста δ - μ -ОР пептида даларгин с 2 по 6 сутки жизни не влияло на гравиметрические показатели 7-суточных животных. Показатели ДНК-синтетической активности гепатоцитов после введения даларгина также оставались без изменений. Было зарегистрировано повышение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов на 15% после пятикратного введения даларгина.

У 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых в раннем постнатальном периоде введению даларгина, не было изменений массы тела, абсолютной массы печени и морфометрических параметров гепатоцитов. При этом было зарегистрировано снижение относительной массы печени на 8,45% и увеличение доли двуядерных гепатоцитов в популяции клеток на 34,75% у подопытных животных по сравнению с группой контроля. Таким образом, неонатальное введение даларгина привело к стимуляции ядрышкового аппарата гепатоцитов у 7-суточных животных и увеличению количества двуядерных гепатоцитов у 60-суточных животных.

Пятикратное введение НАЛЭ с 2 по 6 день жизни белым крысам не влияло на исследуемые показатели 7-суточных животных. У 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых в раннем постнатальном периоде введению НАЛЭ, гравиметрические показатели, показатели количества и размеров ядрышек

гепатоцитов не отличались от контроля. Было зарегистрировано увеличение размеров гепатоцитов на 35,5% и их ядер на 29,7%. Таким образом, у 60-суточных животных, подвергнутых в неонатальном периоде онтогенеза введению пептида НАЛЭ, имели место морфологические признаки гипертрофии гепатоцитов.

В целом, введение в неонатальном периоде аналогов лей-энкефалина, как имеющих аффинность к ОР (даларгин), так и не связывающихся с ОР (НАЛЭ) вызывало сходные эффекты, преимущественно анаболической направленности.

Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению аналогов лей-энкефалина

Пятикратное введение даларгина с 2 по 6 сутки жизни отменяло негативное влияние АНГ на гравиметрические показатели, параметры ДНК-синтетической активности гепатоцитов (ИМЯ) и количество ядрышек в ядрах гепатоцитов у 7-суточных животных (Таблица 3).

Пятикратное введение НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни не корректировало гравиметрических показателей и показателей ядрышкового аппарата гепатоцитов 7-суточных животных, подвергнутых антенатальному гипоксическому воздействию. У крыс группы «АНГ+НАЛЭ» масса тела, абсолютная масса печени и количество ядрышек гепатоцитов оставались достоверно ниже контрольных параметров (Таблица 3). Вместе с тем, введение пептида НАЛЭ нивелировало индуцированное АНГ угнетение ДНК-синтетической активности гепатоцитов 7-суточных животных. Более того, средний показатель ИМЯ в печени подопытных животных достоверно превышал контрольный показатель в 1,49 раза (Таблица 3).

При анализе показателей свободнорадикального окисления в гомогенатах печени 7-суточных животных группы «АНГ+даларгин» мы зарегистрировали нормализацию показателя амплитуды H₂, характеризующей резистентность к перекисному окислению (Таблица 2). Остальные параметры хемилюминесценции оставались выше контрольных показателей, но были ниже

показателей группы «АНГ». Изменения показателей свободнорадикального окисления в группе «АНГ+НАЛЭ» были сходными.

Таким образом, хемилюминесцентное исследование гомогенатов печени 7-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию и получавших в неонатальном периоде пептиды, выявило уменьшение выраженности окислительного стресса и увеличение активности антиоксидантной защиты на органном уровне, по сравнению с животными, не получавшими пептидной коррекции.

Результаты проведенного исследования показали, что неселективный агонист δ -/ μ -ОР пептид даларгин нивелирует негативное влияние АНГ на гравиметрические и морфологические показатели печени новорожденных белых крыс и существенно снижает выраженность окислительного стресса на органном уровне. НАЛЭ вызывает частичную коррекцию негативных последствий АНГ у 7-суточных животных.

У 60-суточных крыс-самцов группы «АНГ+даларгин» сохранялся дефицит массы тела (Таблица 3). В группе «АНГ+НАЛЭ» соматометрические показатели не отличались от группы «Контроль». Неонатальное введение даларгина и НАЛЭ нивелировало уменьшение размеров гепатоцитов и суммарной площади ядрышек у 60-суточных крыс-самцов, перенесших АНГ (Таблица 3).

У 60-суточных животных, перенесших АНГ, неонатальное введение даларгина приводило к снижению выраженности окислительного стресса на органном уровне и на уровне организма в целом. Показатели ХМЛ в гомогенатах печени и сыворотке крови 60-суточных животных группы «АНГ+даларгин» оставались выше контрольных параметров, однако эти показатели были ниже параметров группы «АНГ» (Таблица 2). Применение НАЛЭ в неонатальном периоде полностью отменяло негативное влияние АНГ на свободнорадикальные процессы в печени 60-суточных крыс (Таблица 2).

Таблица 2 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов печени и сыворотки крови белых крыс исследуемых групп

Ткань/возраст	Группы	Ссп, отн. ед	Инд. ХМЛ (Fe^{2+})		Инд. ХМЛ (люминол- H_2O_2)	
			Н1, отн.ед	Синд1,отн.ед	Н2, отн.ед	Синд2, отн.ед
ПЕЧЕНЬ						
7-суточные животные	Контроль	1,32±0,07	1,17±0,09	3,27±0,11	4,30±0,27	8,18±0,36
	АНГ	2,78±0,12*	2,76±0,12*	6,83±0,30*	13,39±0,55*	17,22±0,51*
	АНГ+Даларгин	1,79±0,09* #	1,78±0,15* #	4,94±0,34* #	5,10±0,35 #	9,47±0,33* #
7-суточные животные	Контроль	1,86±0,16	1,96±0,12	5,91±0,49	6,73±0,48	10,53±0,77
	АНГ	5,57±0,46*	5,99±0,27*	9,53±0,55*	17,66±0,64*	23,32±1,14*
	АНГ+НАЛЭ	3,91±0,18*#	4,07±0,25*#	7,78±0,42*#	13,55±1,04*#	16,63±1,15*#
60-суточные животные	Контроль	1,84±0,29	1,93±0,26	5,20±0,86	5,88±0,97	10,26±1,87
	АНГ	4,94±0,48 *	5,37±0,61*	10,55±1,16*	16,90±1,83*	24,94±3,71*
	АНГ+Даларгин	2,31±0,44* #	2,64±0,52* #	7,10±0,62* #	12,99±1,86* #	15,30±2,82* #
	АНГ+НАЛЭ	2,02±0,64 #	2,27±0,55 #	5,65±0,85 #	6,24±0,24 #	11,21±1,44 #
КРОВЬ						
60-суточные животные	Контроль	0,19±0,02	0,14±0,01	0,47±0,03	1,75±0,09	2,01±0,15
	АНГ	0,49±0,03*	0,48±0,02*	1,16±0,07*	3,93±0,28 *	5,70±0,39*
	АНГ+Даларгин	0,36±0,02* #	0,30±0,03* #	0,81±0,05* #	2,96±0,21* #	4,72±0,27* #
	АНГ+НАЛЭ	0,28±0,02 *#	0,22±0,02*#	0,62±0,05*#	2,16±0,10*#	3,50±0,15*#

Примечание - * - $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль»; # - $p < 0,05$ отношению к группе «Аntenатальная гипоксия»

Таблица 3 – Морфологические показатели 7- и 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептидов даларгин и НАЛЭ

Показатель	Контроль	АНГ	АНГ+даларгин	АНГ + НАЛЭ
7-суточные животные				
Масса тела, г	16,07±0,61	10,83±0,91*	14,46±2,01	11,21±1,14*
Абсолютная масса печени, мг	503,75±13,75	367,13±20,42*	512,86±54,06	394,25±40,81*
Относительная масса печени, %	3,16±0,12	3,46±0,15	3,70±0,19	3,51±0,12
Индекс меченных ³ Н-тимидином ядер, ИМЯ, %	2,37±0,44	1,34±0,26*	2,20±0,34	3,54±0,35*
Интенсивность метки (ИМ)	10,78±0,50	10,39±0,57	10,97±0,48	13,23±1,09
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,73±0,04	2,56±0,04*	2,62±0,05	2,31±0,08*
60-суточные животные				
Масса тела, г	281,67±9,20	249,44±7,97*	256,18±5,90*	274,33±9,69
Абсолютная масса печени, г	11,10±0,72	10,07±0,58	10,55±0,45	11,15±0,70
Относительная масса печени, %	3,95±0,11	4,01±0,13	4,09±0,11	3,73±0,40
Площадь гепатоцитов, мкм ²	809,15±19,21	746,69±11,39*	882,34±30,28*	884,17±64,15
Площадь ядер гепатоцитов, мкм ²	98,734±2,96	92,77±3,03	99,52±2,21	101,34±3,35
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,26±0,09	2,05±0,13	2,51±0,10	2,49±0,15
Суммарная площадь ядрышек, мкм ²	7,424±0,34	5,95±0,29*	7,02±0,35	6,34±0,32
Доля двуядерных гепатоцитов, %	22,8±2,05	18,70±0,70	24,55±1,10	25,00±1,36

Примечание - * - $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль»

Показатели ХМЛ гомогенатов печени 60-суточных животных группы «АНГ+НАЛЭ» не отличались от показателей группы «Контроль». Это свидетельствует о выраженном корригирующем влиянии неонатального введения НАЛЭ на отдаленные последствия АНГ.

Таким образом, агонист ОР даларгин и неопиатный аналог лей-энкефалина пептид НАЛЭ оказывали однонаправленные корригирующие влияния на негативные ранние и отдаленные последствия антенатальной гипоксии в печени. У 7-суточных животных даларгин оказывал более выраженное, чем НАЛЭ, нормализующее влияние на состояние печени. По-видимому, аффинность к ОР является важной частью механизмов гепатопротективного влияния пептидов в раннем постнатальном периоде. У 60-суточных животных НАЛЭ оказывал более выраженное корректирующее влияние на состояние печени. Механизмы долгосрочных эффектов НАЛЭ требуют дальнейшего исследования.

Результаты проведенного исследования показывают эффективность неонатального применения пептидов даларгин и НАЛЭ для коррекции негативных влияний АНГ на состояние печени млекопитающих. Неопиатный аналог лей-энкефалина представляет особый интерес, как перспективное средство для коррекции негативных влияний АНГ.

ВЫВОДЫ

1. У 7-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, имеет место активация свободнорадикального окисления в ткани печени, сопровождающаяся угнетением пролиферативной и белок-синтетической активности гепатоцитов.
2. У 60-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, сохраняются проявления окислительного стресса на тканевом и системном уровне; при этом регистрируются уменьшение площади гепатоцитов и их ядер, а также признаки угнетения белок-синтетической активности гепатоцитов (уменьшение количества и размеров ядрышек).

3. Введение новорожденным животным с 2 по 6 сутки жизни агониста δ/μ -опиатных рецепторов пептида даларгин приводит к активации ядрышкового аппарата гепатоцитов у 7-суточных животных и увеличению количества двуядерных гепатоцитов у 60-суточных крыс-самцов.
4. Введение неопиатного аналога лей-энкефалина с 2 по 6 сутки жизни в дозе 100 мкг/кг не влияет на исследуемые параметры печени 7-суточных белых крыс и приводит к увеличению средней площади гепатоцитов, средней площади ядер гепатоцитов и доли двуядерных гепатоцитов у 60-суточных крыс-самцов.
5. Неонатальное введение агониста δ/μ -опиатных рецепторов пептида даларгин животным, перенесшим антенатальную гипоксию, уменьшает выраженность окислительного стресса и нормализует структурные показатели печени 7-суточных белых крыс. Корректирующий эффект неонатального введения неопиатного аналога лей-энкефалина у 7-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию, выражен существенно меньше.
6. Неонатальное введение агониста δ/μ -опиатных рецепторов пептида даларгин частично корректирует последствия антенатальной гипоксии у 60-суточных животных: регистрируется увеличение размеров гепатоцитов на фоне уменьшения выраженности окислительного стресса на тканевом и системном уровне.
7. Неонатальное введение неопиатного аналога лей-энкефалина нивелирует последствия антенатальной гипоксии у 60-суточных животных. Неопиатный аналог лей-энкефалина является перспективным средством коррекции ранних и отдаленных постгипоксических изменений гепатоцитов у млекопитающих.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ:

1. Влияние антенатальной гипоксии на некоторые показатели тканевого гомеостаза печени белых крыс / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, Д. В. Яковенко, С. С. Тимошин, С. К. Пинаев, Е. Н. Сазонова // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2014. – Т. 157, № 3. – С. 301-304.
2. Пинаева, О. Г. Влияние опиоидных пептидов на некоторые показатели тканевого гомеостаза печени новорожденных белых крыс / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Дальневост. медицин. журнал. - 2014. - № 2. - С. 79-83.
3. Коррекция пептидами семейства опиоидов негативного влияния антенатальной гипоксии на тканевой гомеостаз печени новорожденных белых крыс / О. Г. Пинаева, Е. Н. Сазонова, О. А. Лебедько, С. С. Тимошин // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2016. – Т. 162, № 8. – С. 165-168.
4. Влияние неонатального введения даларгина на морфометрические показатели гепатоцитов и свободнорадикальное окисление в организме белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, С. К. Пинаев, Е. Н. Сазонова // Дальневост. медицин. журнал. - 2017. - № 3. - С. 67-71.

Работы, опубликованные в сборниках трудов и материалах международных конференций, конференций с международным участием:

5. Яковенко, Д. В. Влияние дигидрокверцетина на некоторые показатели структурного гомеостаза различных клеточных популяций белых крыс / Д. В. Яковенко, А. А. Симанкова, О. Г. Пинаева // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 70-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов ДВГМУ с международным участием. – Хабаровск, 2013. - С. 36-40

6. Пинаева, О. Г. Отдаленные эффекты неонатального введения синтетических аналогов лей-энкефалина на показатели тканевого гомеостаза печени половозрелых белых крыс / О. Г. Пинаева, Е. Н. Сазонова // «Актуальные вопросы медицины» VI Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция, 10-11 мая 2017 г. - Баку, 2017. - С. 156.

7. Пинаева, О. Г. Влияние хронической антенатальной гипоксии на некоторые показатели тканевого гомеостаза печени белых крыс / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Актуальные вопросы неонатологии и педиатрии: сборник научных трудов Дальневосточной научно-практической конференции с международным участием. - Хабаровск, 2017. – С. 102-103.

**Работы, опубликованные в сборниках трудов и материалах
региональных конференций:**

8. Влияние дигидрохверцетина на анаболическую активность гепатоцитов новорожденных белых крыс / Е. Н. Сазонова, О. Г. Пинаева, М. А. Ивасюк, О. В. Дещеня, Д. В. Яковенко // Теоретические, экспериментальные и практические основы формирования регионального рынка БАДов: материалы региональной научно-практической конференции ДВГМУ.- Хабаровск, 2013. - С. 41-45.

9. Пинаева, О. Г. Морфологический подход к анализу структурного следа хронической внутриутробной гипоксии в печени млекопитающих (экспериментальные исследования) / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Современные лабораторные технологии: Сборник научных трудов научно-практической конференции по лабораторной диагностике, посвященной 155-летию со дня образования города Хабаровска. – Хабаровск, 2013. - С. 50-56.

10. Влияние дигидрохверцетина на структурный гомеостаз различных клеточных популяций новорожденных белых крыс / Д. В. Яковенко, А. А. Симанкова, О. Г. Пинаева, Е. Н. Сазонова // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: материалы I региональной научной конференции ДВГМУ. – Хабаровск, 2014. - С. 61-65.

11. Пинаева, О. Г. Влияние неопиатного аналога лей-энкефалина на некоторые показатели тканевого гомеостаза печени белых крыс / О. Г. Пинаева, Е. Н. Сазонова, Е. А. Варавина // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: материалы I региональной научной конференции ДВГМУ. – Хабаровск, 2014. - С. 34-38.

12. Отдаленные структурные последствия антенатальной гипоксии / Е. Н. Сазонова, А. А. Симанкова, О. Г. Пинаева, С. И. Зубенко // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: материалы II региональной научной конференции ДВГМУ. – Хабаровск, 2015. – С. 42-49

13. Пинаева, О. Г. Коррекция ранних и отдаленных последствий антенатальной гипоксии для тканевого гомеостаза печени с помощью регуляторных пептидов группы опиоидов / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: материалы III региональной научной конференции ДВГМУ, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ С.С. Тимошина. – Хабаровск, 2017. –С. 45-55.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АНГ - антенатальная гипоксия

ИМ – интенсивность метки

ИМЯ – индекс меченых ядер

НАЛЭ - неопиатный аналог лей-энкефалина

ОП – опиоидные пептиды

ОР - опиатные рецепторы

СРО – свободнорадикальное окисление

ХМЛ – хемилюминесценция

ЯОР – ядрышкообразующие районы хромосом

δ/μ - ОР – дельта/мю-опиатные рецепторы

Подписано в печать 22 января 2018 г. Формат 60x84/16.

Бумага офсетная. Усл. печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ № 1

Издательство ФГБОУ ВО ДВГМУ.

680000, г. Хабаровск, ул. Пушкина, 31.

Отпечатано в типографии издательства ФГБОУ ВО ДВГМУ.

680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35.