

*Е.В. Чаплинская<sup>1</sup>, Н.Б. Горбунова<sup>2</sup>*

**Изменение уровня фактора роста нервов и  $\alpha 2$ -макроглобулина в печени самцов мышей при моделировании различных функциональных состояний адренореактивных структур**

*<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет,  
<sup>2</sup>Институт физиологии НАН Беларуси*

Введение адренолитиков (анаприлина, фентоламина), гормонов (адреналина, дексаметазона), а также их сочетанные курсы в дозах, превышающих терапевтические, приводили к снижению или тенденции к нему содержания фактора роста нервов и  $\alpha 2$  макроглобулина в печени самцов мышей. Эффекты фентоламина и адреналина более выражены по отношению к фактору роста нервов, а анаприлина и дексаметазона — к  $\alpha 2$  макроглобулину. В присутствии гормонов фентоламин сохранял большую эффективность на уровень фактора роста нервов в печени, по сравнению с введением анаприлина. В случае  $\alpha 2$ -макроглобулина картина инверсировалась: в сочетании гормонами стали более выраженными эффекты фентоламина.

Ключевые слова: фактор роста нервов,  $\alpha 2$ -макроглобулин, адренореактивные структуры, адреноблокаторы, фентоламин, анаприлин, дексаметазон, адреналин печень.

Печень в организме животных и человека выполняет ряд уникальных функций - барьерная, детоксикационная, выделительная; играет важную роль в пищеварении, расщеплении, синтезе большого количества веществ, утилизации ксенобиотиков, биотрансформации лекарств [9]. В этой связи, различного рода нарушения в деятельности гепатоцитов могут иметь необратимые деструктивные последствия для жизнедеятельности организма. Изучение состояния компенсаторно-восстановительных реакций печени в условиях действия повреждающих факторов является весьма актуальной областью исследования. В настоящее время пристальное внимание уделяется изучению механизмов регуляции и стимуляции восстановительных процессов с нейрогенной позиции, учитывая, что патология печени является системным процессом и в регуляции репарации печени важная роль принадлежит нервной системе.

Установлено, что звездчатые клетки являются источником нейротрофинов (НТ) и их рецепторов (Trk-B, Trk-C, p75) в норме и при ряде патологических состояний печени у крыс и человека [12]. Констатирована стимуляция синтеза фактора роста нервов (ФРН) гепатоцитами в ходе их регенерации [13], канцерогенеза [15], фибринолиза, формирования камней в желчных протоках [18], после токсического повреждения четыреххлористым углеродом [17]. Токсическая энцефалопатия, вызванная изолированным введением солей свинца, аммония, и их сочетанным применением, сопровождалась изменениями содержания ФРН в печени самцов крыс [7]. После обработки крыс нитратом свинца (0,1 ммоль/ кг), на фоне гиперплазии печени, в ней происходило увеличение уровня генной экспрессии ФРН, МПНФ, НТ-3, p75 и TrkA, коррелирующего с массой печени [16]. Очевидно, НТ играют существенную роль в защите ткани печени от гиперплазии, индуцированной

нитратом свинца.

Известно, что биологически активная  $\beta$ -субъединица фактора роста нервов ( $\beta$ -ФРН) образует комплекс с высокомолекулярным ингибитором протеаз  $\alpha$ 2-макроглобулином ( $\alpha$ 2МГ) [14], способным ограничивать субстратную специфичность практически всех четырех классов протеолитических ферментов и наращивать устойчивость последних к другим ингибиторам крови [1,2].

Основным источником  $\alpha$ 2МГ в организме являются гетатоциты [1,2]. В сыворотке крови больных вирусным гепатитом обнаружено снижение концентрации  $\alpha$ 2МГ, более выраженное при тяжелых формах заболевания [4]. По одному источнику отмечено уменьшение его уровня при различных формах цирроза печени [19], по другому – увеличение [8]. Причина расхождений, очевидно, заключается в исследовании показателя в различные фазы заболевания. Резкий подъем содержания  $\alpha$ 2МГ в крови при острой печеночной недостаточности является крайне неблагоприятным прогностическим признаком [11]. Это, очевидно, связано с присутствием в кровотоке форм белков, как обладающих способностью образовывать активные комплексы с протеазами, так и не вступающих во взаимодействие с ними. О роли нарушения функции синтеза  $\alpha$ 2МГ в печени при патологических состояниях свидетельствует факт, что уровень этого белка не отличается от нормы у пациентов с холецистохолангитами и гемолитическими анемиями, сопровождающимися желтухой. Получены данные об уровне  $\alpha$ 2МГ в печени экспериментальных животных при гипоксии [3]. Однако, физиологические механизмы этих изменений неясны. Учитывая вышеизложенное, можно констатировать, что дальнейшие экспериментальные наработки по детализации роли адренореактивных структур, опосредующих эффекты симпатoadренальной системы (САС), а также гормональных звеньев регуляции на содержание  $\beta$ -ФРН и  $\alpha$ 2МГ в печени явились бы крайне своевременными.

Цель работы: выяснить характер и некоторые механизмы влияния адреноблокаторов (фентоламин, анаприлин), гормонов (адреналин, дексаметазон) и их сочетания на содержание биологически активной субъединицы  $\beta$ -ФРН и  $\alpha$ 2МГ в печени самцов мышей.

Материалы и методы. Работа выполнена на половозрелых самцах мышей линии Af массой 22—27 г, содержащихся в стандартных условиях вивария Института физиологии НАН Беларуси, которые, согласно решению конкретных задач, были поделены на группы — от 6 до 11 особей каждая.

В 1-ой серии экспериментов изучалось содержание  $\beta$ -ФРН в ткани печени при использовании превышающих терапевтические дозы  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокаторов, а также стимулятора  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренореактивных систем адреналина и синтетического аналога кортикостероидов дексаметазона. Первой группе ( $n=6$ ) мышей двукратно, внутрибрюшинно, в объеме 100 мкл, вводили:  $\beta$ -адреноблокатор анаприлин (индерал) (60 мг/кг), а второй ( $n=6$ ) –  $\alpha$ -адреноблокатор фентоламин (25 мг/кг). Временной интервал между первым и вторым уколом составил 24 ч. Забор тканей проводили через 1ч после второй инъекции каждого из адреноблокаторов с учетом длительности их

фармацевтического воздействия. Контрольным животным внутрибрюшинно, двукратно вводили воду для инъекций в объеме 100 мкл. Третья (n=12) и четвертая (n=10) группы получали однократно, соответственно, адреналин (0,8 мг/кг) или дексаметазон (2 мг/кг).

Во 2-ой серии опытов первой группе животных (n=6) сочетано вводили адреналин (0,8 мг/кг) и дексаметазон (2 мг/кг). Второй (n=12) и третьей (n=12) группам животных вслед за инъекцией блокаторов, соответственно, анаприлина (60 мг/кг) или фентоламина (25 мг/кг) следовало комбинированное введение адреналина (0,8 мг/кг) и дексаметазона (2 мг/кг). Затем через 24 ч курс дополнялся повторным применением одного из антагонистов адренорецепторов. Через 1 ч животных брали в опыт. Контролем для всех экспериментальных групп животных служили особи, которым по той же схеме внутрибрюшинно вводили воду для инъекций в объеме 100 мкл.

Исследования проводились на 10-процентном гомогенате печени, приготовленном на 0,01 М фосфатном буфере рН 7,38. Для количественного определения  $\beta$ -ФРН использован вариант двухсайтового твердофазного иммуноферментного анализа с чувствительностью 0,5—1 нг/мл [10]. Уровень а2МГ в супернатантах печени устанавливали энзиматическим методом по торможению расщепления N-бензоил-D,L-аргинин-p-нитроанилида (БАПНА) [14]. Комплекс а2МГ — трипсин нечувствительный к соевому ингибитору, сохраняет способность расщеплять этот субстрат. Результаты обрабатывали статистически с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Применение фентоламина вызывало достоверное падение уровня  $\beta$ -ФРН в гепатоцитах на 53% ( $P < 0,05$ ) и не сказывалось на количестве а2МГ в печени – 94% ( $P > 0,05$ ) по отношению к контролю (Рис. 1.1). После введения анаприлина самцам мышей происходит снижение концентрации  $\beta$ -ФРН и а2МГ в печени, соответственно, на 34% ( $P > 0,05$ ) и 25% ( $P < 0,01$ ) по сравнению с контролем (Рис. 1.2). Изменение состояния  $\alpha$ -адренергических систем с помощью фентоламина.

Различное по степени выраженности снижение уровня ФРН и а2МГ в ткани печени самцов мышей после введения адреноблокаторов, по всей видимости, может являться следствием уменьшения их синтеза гепатоцитами. Показано, что импульсы из центральной нервной системы к сосудам печени передаются по симпатическим адренергическим нервным волокнам через васкулярные  $\alpha$ -адренорецепторы. Плотность распределения  $\alpha$ -адренорецепторов в сосудах печени иногда превышает плотность  $\beta$ -адренорецепторов. Известно, что плотность  $\alpha$ -адренорецепторов в печеночной ткани у крыс в норме составляет 946+100 для гепатоцитов, 581+90 для внутрипеченочных артериальных сосудов, 362+92 для внутрипеченочных портальных сосудов в расчете на 10 микрон.

Использование адреналина (Рис. 2.1) способствовало уменьшению уровня нейроростового протеина на 34% ( $P < 0,05$ ) и а2МГ на 19%. Этот гормон связывается (и активирует) как  $\alpha$ -, так и  $\beta$  – адренорецепторами, поэтому его действие на ткань, содержащую рецепторы обоих классов, зависит от относительного сродства этих рецепторов к лиганду.

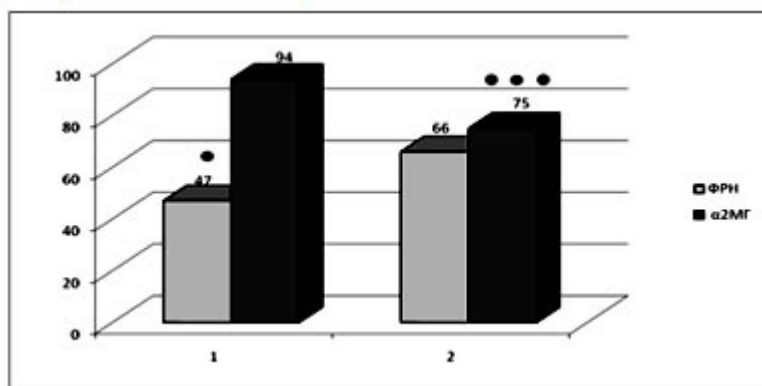


Рисунок 1. Изменение содержания ФРН и  $\alpha$  2МГ в печени самцов мышей после введения адреноблокаторов: 1 – фентоламин; 2 – анаприлин (в процентах по отношению к контрольным, получавшим  $H_2O$ ; \* –  $P < 0,05$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ ).

Помимо катехоламинов, важную роль в адаптации организма к любым стрессам играют гормоны коры надпочечников. Однако, после введения дексаметазона, имеющего принципиально другой механизм воздействия на компетентные клетки – не отмечалось достоверных изменений уровня тестируемых показателей (Рис. 2.2): содержание  $\beta$ -ФРН оказалось сходным с контрольными показателями, а для  $\alpha$ 2МГ отмечена тенденция к снижению (на 24%) его количества в ткани печени. Эти данные косвенно могут подтверждать значимость именно  $\alpha$ - и  $\beta$  – адренореактивных структур в поддержании уровня нейроростового протеина и  $\alpha$ 2МГ в исследуемом органе.

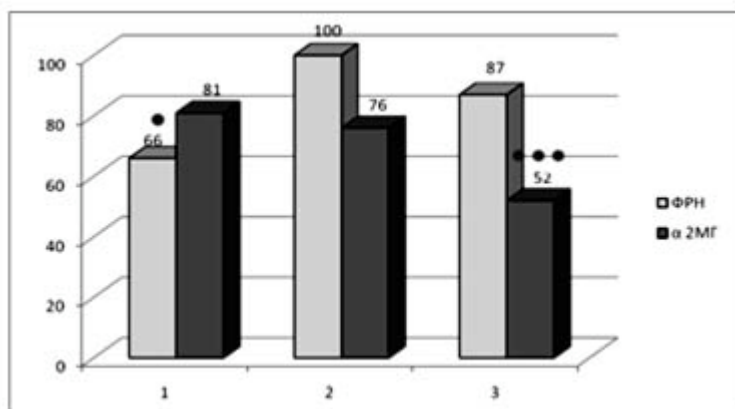


Рисунок 2. Изменение содержания ФРН и  $\alpha$  2МГ в печени самцов мышей после введения гормонов: 1 – адреналин, 2 – дексаметазон, 3 – адреналин + дексаметазон (в процентах по отношению к контрольным, получавшим  $H_2O$ ; \* –  $P < 0,05$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ ).

После совместного использования гормонов (адреналин+дексаметазон) (Рис. 2.3) – зафиксирована тенденция к снижению концентрации  $\beta$ -ФРН в гепатоцитах, свидетельствующая либо об угнетении процессов его биосинтеза и секреции, либо об интенсификации метаболического клиренса в данной ткани. Наблюдается значимое уменьшение содержания  $\alpha$ 2МГ в цитозоле печени при совместном применении препаратов (на 48%,  $P < 0,001$ ),

демонстрирующее синергизм в действии гормонов (Рис. 2.3) по сравнению с контрольным введением растворителя.

Совместное с гормонами введение фентоламина имело большую эффективность в снижении концентрации тестируемых показателей – соответственно, на 19% б-ФРН и на 24%  $\alpha$ 2МГ ( $P < 0.05$ ) по сравнению с контролем (Рис. 3.1). Комбинирование анаприлина с гормонами (Рис. 3.2.) вызывало лишь тенденцию к снижению уровня нейроростового протеина – на 7% , а  $\alpha$ 2МГ - на 21% ( $P < 0.05$ ) в печени по сравнению с контролем.

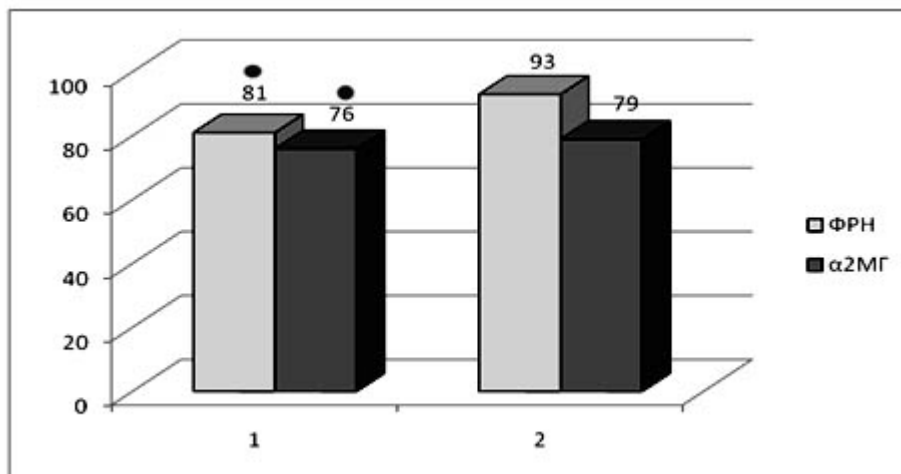


Рисунок 3. Изменение содержания ФРН и  $\alpha$ 2МГ в печени самцов мышей при совместном с гормонами введении адреноблокаторов (анаприлин или фентоламин): 1 – Фентоламин + (адреналин + дексаметазон); 2 - Анаприлин + (адреналин + дексаметазон). В процентах по отношению к контрольным, получавшим H<sub>2</sub>O (\* –  $P < 0,05$ ).

Как уже упоминалось, основным местом синтеза  $\alpha$ 2МГ в организме является печень [1, 2]. Очевидно, воздействие адреноблокаторов и гормонов приводит к блокаде его синтеза в этом органе. Направленность изменения уровня  $\alpha$ 2МГ в печени совпадает с результатами [6], о влиянии окислительного стресса после введения хлорида кобальта. Печень играет ключевую роль в удалении циркулирующих комплексов протеаза– $\alpha$ 2МГ. Пониженный уровень  $\alpha$ 2МГ в цитозоле печени может быть связан с выведением комплексов протеаза– $\alpha$ 2М из кровотока и внеклеточного пространства в созданных экспериментальных обстоятельствах. Помимо участия в контроле протеолиза,  $\alpha$ 2МГ — важный регулятор межклеточных взаимодействий [4]. Так  $\alpha$ 2МГ является практически монополярным переносчиком факторов роста, интерлейкинов, интерферонов [4, 5].

Таким образом, введение адренолитиков (анаприлина, фентоламина), гормонов (адреналина, дексаметазона), а также их сочетанные курсы в дозах, превышающих терапевтические, приводили к снижению или тенденции к нему содержания б-ФРН и  $\alpha$ 2МГ в печени самцов мышей. Констатирована определенная специфичность действия адреноблокаторов и гормонов: эффекты фентоламина и адреналина более выражены по отношению к б-ФРН, а анаприлина и дексаметазона — к  $\alpha$ 2МГ. В присутствии гормонов влияние фентоламина имело большую эффективность на уровень б-ФРН в печени, по

сравнению с введением анаприлина. В случае  $\alpha 2$  МГ картина инверсировалась: в присутствии гормонов стали более выраженными эффекты фентоламина. Это свидетельствовало о причастности гормонов к изменению функционального состояния адренореактивных структур, опосредующих влияние на содержание  $\alpha 2$  МГ и  $\beta$ -ФРН в печени. Наличие синхронных изменений уровня нейростового протеина и  $\alpha 2$ МГ в печени самцов мышей при моделировании различных функциональных состояний адренореактивных структур позволяет предполагать наличие взаимосвязи между данными регуляторными белками. Частные различия в степени подавления количества биологических регуляторов могут быть связаны со спецификой акцентного влияния адреноблокаторов на адренорецепторные структуры печени.

Полученные результаты важны для понимания механизмов реакций стресса, воспаления, контроля проведения стероидной терапии.

### Литература

1. Веремеенко, К. Н. Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения / К. Н. Веремеенко. Киев, 2000.
2. Горбунова, Н. Б. О роли  $\alpha 2$ -макроглобулина в нервной системе / Н. Б. Горбунова, В. Н. Никандров // Новости медико-биологических наук. 2004. № 2. С. 81–91.
3. Горбунова, Н. Б. Влияние мелатонина на уровень ингибиторов протеаз в сыворотке крови и печени самцов крыс при гипоксии / Н. Б. Горбунова, Г. К. Тропникова // Сб. научн. трудов Респ. научно-практ. центра гигиены «Здоровье и окружающая среда». Минск, 2008. Вып. 12. С. 265–271.
4. Дубровин, С. М. Альфа $2$ -макроглобулин: современное состояние вопроса / С. М. Дубровин, А. В. Муромцев, Л. И. Новикова // Клин. лаб. диагн. 2000. № 6. С. 3–7.
5. Зорин, Н. А. Универсальный модулятор цитокинов –  $\alpha 2$ -макроглобулин / Н. А. Зорин, В. Н. Зорина, Р. М. Зорина // Иммунология. 2004. №5. С. 302–304.
6. Калиман, П. А. Система протеиназа – ингибитор протеиназ у крыс при оксидантном стрессе, вызванном введением хлорида кобальта / П. А. Калиман, А. А. Самохин, Л. М. Самохина // Укр. биох. журнал. 2000. Т. 72. С. 89–92.
7. Калюнов, В. Н. Влияние токсических энцефалопатии на концентрацию полипептидных факторов роста в крови и некоторых тканях крыс / В. Н. Калюнов [и др.] // Экологическая антропология. Минск, 1999. С. 418–421.
8. Карягина, И. Ю. Использование метода комплексного определения активности  $\alpha 1$  –антитрипсина и  $\alpha 2$ -макроглобулина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Карягина, Б. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лаб. дело. 1990. № 2. С. 72–73.
9. Козырев, М. А. Заболевания печени и желчных путей / М. А. Козырев. Минск: «Белорусская наука», 2002. 247 с.
10. Чаплинская, Е. В. Иммуноферментный анализ содержания фактора роста нервов ( $\beta$ -ФРН) в жидкостных средах животных и человека / Е. В.

Чаплинская, В. С. Лукашевич, В. Н. Калюнов // Весці НАНБ. Сер. біял. навук. 1998. № 3. С. 72–75.

11. Шувалова, Е. П. Успехи гепатологии: сб. научн. ст. / Е. П. Шувалова [и др.]. Рига, 1988. Вып. 14. С. 204–209.

12. Cassiman, D. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors / D. Cassiman [et al.] // *Hepatology*. 2001. Vol. 33. P. 148–158.

13. Fausto, N. Liver regeneration / N. Fausto, J. S. Campbell, K. J. Riehle // *Hepatology*. 2006. Vol. 43. P. S45–S53.

14. Koo, P. H. Inhibition of nerve growth factor –stimulated neurite outgrowth by methylamine - modified alpha2 – macroglobulin / Koo P. H., St ach R. W. // *J. Neurosci. Res*. 1992. Vol. 31, № 4. P. 678–692.

15. Kishibe, K. Production of nerve growth factor by mouse hepatocellular carcinoma cells and expression of TrkA in tumor-associated arteries in mice / K. Kishibe, Y. Yamada, K. Ogawa // *Gastroenterology*. 2002. Vol. 122, № 7. P. 1978–1986.

16. Nemoto, K. Gene expression of neurotrophins and their receptors in lead nitrate-induced rat liver hyperplasia / K. Nemoto [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. Vol. 275, № 2. P. 472–476.

17. Oakley, F. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis / F. Oakley [et al.] // *Am.J.Pathol*. 2003. Vol. 163, № 5. P. 1849–1858.

18. Ohta, T. Expression of nerve growth factor in hepatolithiasis / T. Ohta [et al.] // *Liver*. 1999. Vol. 19, № 6. P. 489–494.

19. Orley, C. Deterioration of alpha 2-macroglobulin in hepatic diseases / C. Orley // *Cell Mol. Biol. Incl.Cyto Enzymol*. 1980. Vol. 26, № 4. P. 437–42.