

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Краткое сообщение

УДК 616.33–002.1

doi:10.18499/2225-7357-2022-11-4-58-62

1.5.22 – клеточная биология



Особенности строения грелин-продуцирующих эндокринных клеток и их реактивные изменения после экспериментального стресса

В. А. Раптанова^{1, 2}, П. С. Бобков^{1, 2}, А. В. Дробленков^{1, 2}✉¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия²Санкт-Петербургский медико-социальный институт, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Работа посвящена анализу реактивных изменений грелин-продуцирующих эндокринных клеток (ГПЭК) в желудке и гипоталамусе при моделировании психоэмоционального стресса и после заместительной терапии. Реактивные ГПЭК в экспериментальных моделях пост-стрессорного расстройства ранее прицельно не исследовались. Между тем практика моделирования стресса для установления эффективности терапевтических воздействий предполагает целесообразность получения новых и информативных критериев оценки степени ее нарушения и терапевтического эффекта.

Цель исследования – установить количественные особенности и реактивные изменения ГПЭК желудка и гипоталамуса в модели психогенного стресса.

Материал и методы. Исследовали парафиновые срезы гипоталамуса и слизистой оболочки кардиальной части желудка у четырех групп половозрелых самцов крыс. Первую группу (n=5) составили интактные крысы. Остальных животных подвергали однократному эмоциональному стрессу. В ноздри животным двух экспериментальных групп (n=5 в каждой) через 12 часов после стресса вводили по 20 мкг раствора грелина (GHRL, Tocris, Gr. Brit.) и пептидного антагониста рецепторов грелина ([D-Lys3]-GHRP-6, Tocris, Gr. Brit.). На 4-е сутки отбирали животных для группы основного контроля (n=5). Число эндокриноцитов латеральной части ядер аркуатного комплекса подсчитывали на площади 0,01 мм², в фундальных железах желудка – на площади 0,015 мм²; площадь тел эндокриноцитов устанавливали при помощи программы Imagescope (Электронный анализ, Россия). Медиану, верхний и нижний квартили, достоверность их различий в сравниваемых группах (используя непараметрический критерий Манна–Уитни) рассчитывали при помощи программы GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, USA). Различия считали статистически значимыми при p<0,01.

Результаты. При краткосрочном переживании психогенного стресса число жизнеспособных желудочных и гипоталамических ГПЭК снизилось в 2,5 и 3,8 раза соответственно (p<0,001), а площадь их тел уменьшилась в 1,5 и 1,6 раза соответственно (p<0,001). Фармакологические способы коррекции значимо не отразились на данных параметрах ГПЭК (p>0,05).

Заключение. Краткосрочное переживание стресса в экспериментальной модели выражается дегенеративными изменениями ГПЭК. Они могут быть частично обратимыми при условии последующего компенсаторного воздействия грелина, способного, по-видимому, оказывать модулирующее влияние на кортиколиберин-продуцирующие нейроны.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, ксенографт, морфологическая валидация, иммуногистохимия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Раптанова В.А., Бобков П.С., Дробленков А.В. Особенности строения грелин-продуцирующих эндокринных клеток и их реактивные изменения после экспериментального стресса // Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т. 11, №4. С. 58–62. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-4-58-62>

BRIEF ARTICLES

Brief article

Structural features of ghrelin-producing endocrine cells and their reactive changes after experimental stress

V.A. Raptanova^{1, 2}, P.S. Bobkov^{1, 2}, A.V. Droblenkov^{1, 2}✉¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia²St. Petersburg Medical and Social Institute, St. Petersburg, Russia

Abstract. The work is devoted to the analysis of reactive changes in ghrelin-producing endocrine cells (HPEC) in the main areas of production of this regulatory peptide – in the stomach and hypothalamus during modeling of psycho-emotional stress and after replacement therapy. Reactive HPECs in experimental post stress disorder models have not previously been specifically studied. Meanwhile, the practice of modeling stress to establish the effectiveness of therapeutic interventions suggests the feasibility of obtaining new and informative criteria for assessing the degree of its impairment and therapeutic effect.

The purpose of the study was to establish quantitative features and reactive changes in the GPEC of the stomach and hypothalamus in a model of psychogenic stress.

Material and methods. We studied paraffin sections of the hypothalamus and the mucous membrane of the cardial part of the stomach in four groups of mature male rats. The first group (n=5) consisted of intact rats. The rest of the animals were subjected to a single emotional stress. In the nostrils of animals of two experimental groups (n=5 in each), 12 hours after stress, 20 µg of a solution of ghrelin (GHRL, Tocris, Gr. Brit.) and a peptide antagonist of ghrelin receptors ([D-Lys3]-GHRP-6, Tocris, Gr. Brit.). On the 4th day, animals were selected for the main control group (n=5). The number of endocrinocytes in the lateral part of the nuclei of the arcuate complex was counted over an area of 0,01 mm², in the fundic glands of the stomach – over an area of 0,015 mm²; the area of endocrinocyte bodies was determined using the Imagescope program (Electronic analysis, Russia). The median, upper and lower quartiles, and the significance of their differences in the compared groups (using the nonparametric Mann–Whitney test) were measured using the GraphPad PRISM 6.0 program (GraphPad Software, USA). Differences were considered significant at p<0,01.

Results. During a short-term experience of psychogenic stress, the number of viable gastric and hypothalamic HPECs decreased by 2,5 and 3,8 times (respectively; p<0.001), and their body area decreased by 1,5 and 1,6 times (p<0,001). Pharmacological methods of correction did not significantly affect these parameters of HPEC (p>0,05).

Key words: ghrelin, endocrine cells, hypothalamus, gastric mucosa, stress, reactive changes

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Raptanova V.A., Bobkov P.S., Droblenkov A.V. Structural features of ghrelin-producing endocrine cells and their reactive changes after experimental stress // Journal of Anatomy and Histopathology. 2022. V. 11, №4. P. 58–62. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-4-58-62>

Введение

Переживание острого психо-эмоционального стресса обычно приводит к формированию синдрома пост-стрессорного расстройства [3]. Механизм его развития связывают с нарушением баланса пептидных эндокринных систем, в первую очередь – системы грелина. Например, в результате аналогичного метода острого стрессирования крыс, содержащихся в одной клетке с питоном, у антагониста рецепторов грелина [D-Lys3]-GHRP6 были выявлена способность повышения содержания дезацилгрелина и анксиолитические свойства [5], сохранившиеся у крыс и после их выращивания в условиях стресса социальной изоляции [4].

Пептидный гормон грелин включает три изоформы: ацилированный грелин, не-ацилированный (дезацилгрелин) и обестатин [6, 11]. Грелин преимущественно синтезируется эндокриноцитами слизистой оболочки кардиальной части желудка, в латеральной части аркуатного комплекса ядер гипоталамуса и поступает в кровоток [1, 9]. Рецепторы к грелину располагаются во многих внутренних органах. Центральные (поведенческие) эффекты грелина связаны с распространением рецепторов к нему в разнообразных церебральных центрах, многие из которых формируют мезокортиколимбическую дофаминергическую систему «положительного вознаграждения» [9, 11].

Введение грелина провоцировало потребление пищи и увеличивало массу тела [7]. Нокаутные мыши по гену рецептора грелина GHSR были не способны в той же степени реагировать на стресс, как интактные животные [12].

Реактивные изменения грелин-продуцирующих эндокринных клеток в экспериментальных моделях пост-стрессорного расстройства ранее прицельно не исследова-

лись. Между тем практика моделирования стресса для установления эффективности терапевтических воздействий предполагает целесообразность получения новых и информативных критериев оценки степени ее нарушения и терапевтического эффекта.

Цель исследования – установить количественные особенности и реактивные изменения ГПЭК желудка и гипоталамуса в модели психогенного стресса.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на 22 самцах крыс Вистар массой 200–220 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Животных содержали в условиях вивария в стандартных пластмассовых клетках при свободном доступе к воде и пище в условиях инвертированного света 8.00–20.00 при температуре 22±2°C. В ходе опыта были соблюдены принципы гуманного отношения к лабораторным крысам в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267). Протокол эксперимента одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 1/20 от 27.02.2020 г.).

Моделировали психическую травму. Суть моделирования состояла в переживании животным обстоятельств гибели партнера от действий хищника [2]. Группу крыс в количестве 12–15 животных помещали в террариум к тигровому питону. Одно животное погибало в результате его пищевых потребностей, остальные крысы в течение 1 часа переживали ситуацию гибели партнера. После этого крыс забирали из террариума.

Через 12 часов после стресса формировали 4 группы животных. Первую и вторую группы (n=5 в каждой) составили интактные крысы и группа основного контроля (стресс

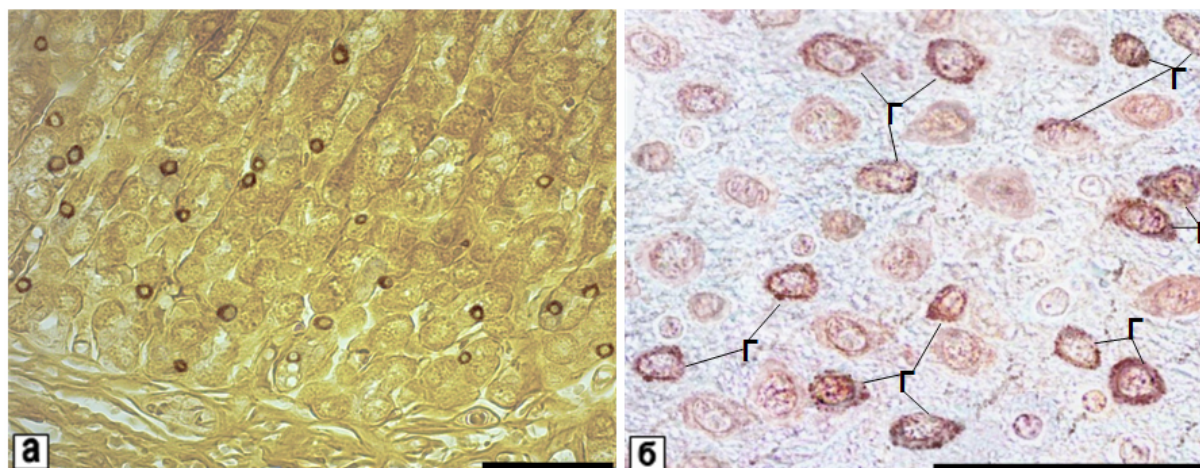


Рис. 1. Особенности распределения и строения эндокриноцитов, продуцирующих грелин, в фундальных железах желудка (а) и в латеральной части медиального гипоталамического ядра (б). Иммуногистохимическое выявление гранул грелина. Препараты дополнительно не окрашены. Г – грелин-продуцирующие нейроны. Ок. 10, об. 40 (а), об. 100 (б); длина мерного отрезка – 50 мкм.

без коррекции). В ноздри животным двух экспериментальных групп ($n=5$ в каждой) вводили по 20 мкг раствора грелина (GHRL, Tocris, Gr. Brit.) и пептидного антагониста рецепторов грелина ([D-Lys3]-GHRP-6, Tocris, Gr. Brit.). На 4-е сутки после стрессирования крыс декапитировали с применением гильотины, извлекали желудки и головной мозг, которые фиксировали в 10% растворе формалина. После стандартной парафиновой проводки готовили срезы желудка и головного мозга толщиной 3 мкм, в которых после постановки иммуногистохимической реакции исследовали эндокринные клетки, продуцирующие гормон грелин. Для обнаружения грелин-продуцирующих эндокринных клеток в глубокой части слизистой оболочки желудка готовили горизонтальные срезы желудка, отступя 0,02 мм от области перехода пищевода в желудок. Грелин-продуцирующие эндокриноциты мозга обнаруживали во фронтальных срезах медиального аркуатного ядра гипоталамуса на уровне bregma $-3,6$ mm, в каудальной части этого ядра, где они ранее были обнаружены [11]. Для идентификации гранул грелина были использованы моноклональные мышиные антитела к GrlRG, (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации 500 µg/ml. Вторичные биотинилированные антитела применяли из набора VECTASTAIN ABC, США. Демаскировали антитела методом кипячения. Проявляли препараты при помощи раствора диаминобензидина. Морфометрию проводили с помощью программы ImageScope (Электронный анализ, Россия).

Исследовали количество, площадь ГПЭК желудка и гипоталамуса у 4 групп половозрелых самцов крыс (по 5 животных массой 200–220 г): интактных и после острого однократного стрессирования, однократного воздействия раствора грелина и антагониста рецепторов грелина, вводимые через 12 часов после стресса через нос.

При использовании пакета статистической программы GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, USA) было установлено, что распределение параметров каждого вариационного ряда было отличным от нормального. Поэтому для установления достоверности различий величин вычисляли их медиану, верхний и нижний квартили, которые сравнивали, используя непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,01$.

Результаты и их обсуждение

Группы мелких гранул пептида грелина были выявлены в глубокой части слизистой оболочки желудка лишь у некоторой части мелких ГПЭК (рис. 1а). Также некоторая небольшая часть тел нейронов периферической части аркуатного комплекса ядер гипоталамуса оказалась грелин-позитивной (рис. 1б). Иммунопозитивные гранулы пептида также были видны, преимущественно по отдельности, между телами гипоталамических ГПЭК.

В результате краткосрочного переживания психогенного стресса число жизнеспособных желудочных и гипоталамических ГПЭК значительно снизилось, а площадь их тел – уменьшилась (табл. 1). Фармакологические способы коррекции значимо не отразились на данных параметрах ГПЭК.

Выявленные дегенеративные изменения ГПЭК являются устойчивыми, в том числе к корректирующей фармакотерапии, и именно эти изменения обуславливают многократное снижение уровня ДАГ в гипоталамусе после стресса [5]. Адаптивные (компенсаторно-приспособительные) изменения, наблюдаемые в слизистой оболочке желудка после стресса и заместительной терапии грелином, могут быть обусловлены его способностью стимулировать выработку гормона роста.

Таблица 1

Показатели грелин-продуцирующих эндокринных клеток в фундальных железах желудка и медиальном аркуатном ядре гипоталамуса при эксперименте у крыс (Me [Q25; Q75])

Способ воздействия	Показатели			
	Количество		Площадь (мкм ²)	
	желудка	гипоталамуса	желудка	гипоталамуса
Нет (интактные крысы)	20,3 [5,2; 4,1]	10,6 [4,6; 3,4]	35,4 [2,5; 1,4]	49,8 [5,8; 6,5]
Стресс	8,1* [4,4; 6,8]	2,8* [1,5; 1,6]	21,5* [4,1; 3,3]	32,7* [4,4; 4,8]
Коррекция грелином	6,8* [6,2; 6,6]	5,0* [3,7; 3,6]	26,1* [5,0; 4,5]	38,1* [4,9; 5,1]
[D-Lys3]-GHRP-6	8,7* [4,8; 5,2]	8,0* [4,6; 4,4]	21,3* [5,7; 6,1]	35,4* [5,6; 5,7]

Примечание: число эндокриноцитов латеральной части ядер аркуатного комплекса подсчитано на площади 0,01 мм², фундальных желез желудка – на площади 0,015 мм²; * – различия значений по сравнению с контролем статистически значимы при $p < 0,001$.

Данная гипотеза подтверждается тем, что наследуемая карликовость сочетается с аномалиями рецептора грелина. Вместе с тем выявлено повышение содержания мРНК кортиколиберина в медио-базальном комплексе ядер гипоталамуса, а также гипертрофия и пролиферация кортикотропоцитов гипофиза под влиянием центрального (мозгового) и периферического (желудкового) пептида грелина [1, 9], что подтверждает его участие в постстрессорной приспособительной реакции. Компенсаторная реакция грелина в аналогичной модели однократного стрессирования выражается частичным восстановлением линейных параметров эпителиальных слизистых клеток, их площади и элементов стромы слизистой оболочки [2]. Следовательно, возможная роль пептида грелина заключается в модуляции кортиколиберин-продуцирующих нейронов.

Заключение

Краткосрочное переживание психоэмоционального стресса в экспериментальной модели выражается дегенеративными изменениями ГПЭК желудка и гипоталамуса. Они могут быть частично обратимыми при условии последующего компенсаторного воздействия грелина, способного, по-видимому, оказывать модулирующее влияние на кортиколиберин-продуцирующие нейроны.

Список источников / References

1. Лобашова В.Л., Шепелькевич А.П. Грелин: синтез, структура, физиологическая роль в организме. Медицинский журнал. 2018;1(63):15–22 [Lobashov VL, Shepelkevich AP. Ghrelin: Synthesis, Structure, Physiological Role in the Body. Medical Journal. 2018;1(63):15–22] (in Russian). EDN: YPPNMN
2. Раптанова В.А., Дробленков А.В., Лебедев А.А., Бобков П.С., Хохлов П.П., Тиссен И.Ю. и др. Реактивные изменения слизистой оболочки желудка и снижение содержания дезацилгрелина в мозге крыс, обусловленные психоэмоциональным стрессом. Обзоры по клинической

- фармакологии и лекарственной терапии. 2021;19(2):203–10 [Raptanova VA, Droblenkov AV, Lebedev AA, Bobkov PS, Khokhlov PP, Thyssen IY, et al. Reactive changes of gastric mucosa and reduction of desacyl ghrelin in rat brain due to psychoemotional stress. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2021 Aug 9;19(2):203–10] (in Russian). EDN: QJFGXA. doi: 10.17816/RCF192203-210
3. Цикунов С.Г., Пшеничная А.Г., Ключева Н.Н., Виноградова Т.В., Денисенко А.Д. Витальный стресс вызывает длительные расстройства поведения и обмена липидов у самок крыс. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2016;4(14):32–41 [Tsikunov SG, Pshenichnaya AG, Klyueva NN, Vinogradova TV, Denisenko AD. Vital stress causes long-lasting behavioral disorders and lipid metabolism deviations in female rats. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2016 Dec 15;14(4):32–41] (in Russian). EDN: XHVWON. doi: 10.17816/RCF14432-41
 4. Шабанов П.Д., Виноградов П.М., Лебедев А.А., Морозов В.И. Грелиновая система мозга участвует в контроле эмоционально-исследовательского поведения и двигательной активности крыс, выращенных в условиях стресса социальной изоляции. Психическое здоровье. 2017;15(5):3–11 [Shabanov PD, Vinogradov PM, Lebedev AA, Morozov VI. Ghrelin System of the Brain Participates In Control of Emotional, Explorative Behavior and Motor Activity in Rats Rearing In Conditions of Social Isolation Stress. Mental health. 2017;15(5):3–11] (in Russian). EDN: YPZQNH
 5. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Морозов В.И. Роль грелина в контроле эмоционального, исследовательского и двигательного поведения при экспериментальном посттравматическом стрессорном расстройстве. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2018;1:65–74 [Shabanov PD, Lebedev AA, Morozov VI. The Role Of Ghrelin In Control Of Emotional, Explorative And Motor Behavior In Experimental Posttraumatic Stress Disorder. Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations. 2018 May 21;1(1):65–74.] (in Russian). doi: 10.25016/2541-7487-2018-0-1-65-74
 6. Chanoine J-P, Wong ACK. Ghrelin Gene Expression Is Markedly Higher in Fetal Pancreas

- Compared with Fetal Stomach: Effect of Maternal Fasting. *Endocrinology*. 2004 Aug 1;145(8):3813–20. doi: 10.1210/en.2004-0053
7. Holsen LM, Lawson EA, Christensen K, Klibanski A, Goldstein JM. Abnormal relationships between the neural response to high- and low-calorie foods and endogenous acylated ghrelin in women with active and weight-recovered anorexia nervosa. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2014 Aug;223(2):94–103. doi: 10.1016/j.psychres.2014.04.015
 8. Horvath TL, Abizaid A, Dietrich MO, Li Y, Takahashi JS, Bass J. Ghrelin-immunopositive hypothalamic neurons tie the circadian clock and visual system to the lateral hypothalamic arousal center. *Molecular Metabolism*. 2012 Dec;1(1-2):79–85. doi: 10.1016/j.molmet.2012.08.003
 9. Howick K, Griffin B, Cryan J, Schellekens H. From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Jan 27;18(2):273. doi: 10.3390/ijms18020273
 10. Jiang H, Betancourt L, Smith RG. Ghrelin Amplifies Dopamine Signaling by Cross Talk Involving Formation of Growth Hormone Secretagogue Receptor/Dopamine Receptor Subtype 1 Heterodimers. *Molecular Endocrinology*. 2006 Aug 1;20(8):1772–85. doi: 10.1210/me.2005-0084
 11. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec;402(6762):656–60. doi: 10.1038/45230
 12. Patterson ZR, Ducharme R, Anisman H, Abizaid A. Altered metabolic and neurochemical responses to chronic unpredictable stressors in ghrelin receptor-deficient mice. *European Journal of Neuroscience*. 2010 Jun 30;32(4):632–9. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07310.x
 13. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 2005;494(3):528–48. doi: 10.1002/cne.20823

Информация об авторах

Раптанова Владислава Андреевна – аспирант; vladislavaraptanova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2905-1154>
 Бобков Павел Сергеевич – канд. мед. наук, научный сотрудник; bobkov_pl@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4858-6170>
 Дробленков Андрей Всеволодович – д-р мед. наук, профессор; Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197022 droblenkov_a@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5155-1484>

Information about the authors

Vladislava A. Raptanova – P.G. stud.; vladislavaraptanova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2905-1154>
 Pavel S. Bobkov – Coct. Med. Sci., researcher, bobkov_pl@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4858-6170>
 Andrei V. Droblenkov – Doct. Med. Sci., Prof.; Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova, 12, St. Petersburg, 197022, Russia droblenkov_a@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5155-1484>

Статья поступила в редакцию 26.08.2022; одобрена после рецензирования 2.11.2022; принята к публикации 5.12.2022.
 The article was submitted 26.08.2022; approved after reviewing 2.11.2022; accepted for publication 5.12.2022.