УДК 616.45-001.1/.3-092-001.18:615.324

ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС И ЕГО КОРРЕКЦИЯ ГИДРОЛИЗАТОМ КУКУМАРИИ ЯПОНСКОЙ

Солодкова О.А., Зенкина В.Г.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, e-mail: solodkova@bk.ru

Повышение адаптационных возможностей к повреждающему воздействию холода является важным моментом профилактики возникновения многих заболеваний и патологических состояний. В экспериментальных условиях исследована возможность коррекции морфофункционального состояния надпочечных желез пероральным введением гидролизата из кукумарии японской. В опытах на 60 половозрелых беспородных крысах – самках массой 180-220 г установлено, что холодовой стресс вызывает комплекс изменений, а именно гипертрофию надпочечников, инволюцию тимуса и селезенки, поражение слизистой оболочки желудка. Получение животными биологически активной добавки «Тингол-1» устраняет изменения стресс-сенситивных органов при холодовом воздействии, предупреждает поражение слизистой желудка, стабилизирует уровень кортизола в крови и сохраняет умеренную липидную насыщенность клеток коры надпочечников.

Ключевые слова: стресс, кукумария, надпочечник

COLD STRESS AND ITS CORRECTION HYDROLYZATE SEA CUCUMBER JAPANESE

Solodkova O.A., Zenkina V.G.

Pacific state medical university, Vladivostok, e-mail: solodkova@bk.ru

Enhancing adaptive capacity to the damaging effects of the cold is an important aspect of prevention of many diseases and pathological conditions. Under experimental conditions, we investigated the possibility of correction of morphofunctional state of the adrenal glands of oral administration of the hydrolyzate of the Japanese sea cucumber. In tests on 60 adult mongrel rats – females weighing 180-220 g determined that cold stress causes complex changes, namely hypertrophy of the adrenal glands, the involution of the thymus and spleen, the defeat of the gastric mucosa. Getting animals dietary supplement «Thingol-1» change eliminates the stress of sensitive organs during cold exposure, prevents gastric mucosal lesion stabilizes the level of cortisol in the blood and keeps moderate lipid saturation of the cells of the adrenal cortex.

Keywords: stress, sea cucumber, adrenal gland

Стресс является ярко выраженной адаптивной реакцией, и в то же время он может провоцировать возникновение или обострение многих патологических состояний [6]. Известно, что стрессорные повреждения значительно нарушают функции надпочечников, выполняющих ключевую роль в процессе адаптации. Надпочечники являются одним из ведущих звеньев гипаталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы, отвечающей за поддержание гомеостаза в различных условиях внешней среды. Функциональное состояние надпочечных желез оказывает существенное влияние на приспособительные реакции организма, что объясняется чрезвычайным многообразием их функций и участием в регуляции всех видов обмена [1].

В настоящее время существует большая группа веществ, обладающих в разной степени антистрессорным действием [4]. Наиболее актуальным является поиск и изучение препаратов, содержащих природные комплексы биологически активных веществ, с целью повышения устойчивости к воздействию стрессовых факторов организма человека и животных [7, 8]. Одним из таких препаратов является биологически активная добавка «Тингол-1», созданная на базе ТИНРО-Центра г. Владивостока. «Тингол-1» представляет собой гидролизат из кукумарии японской (ГКЯ), содержащий тритерпеновые гликозиды (ТГ) не менее 100 мкг/см^3 (патент РФ № 2117435). ТГ голотурий проявляют широкий спектр биологической активности, в частности, они способны тормозить реакции свободнорадикального окисления, способствуя стабилизации внутриклеточных мембранных структур [2, 9, 10].

Целью эксперимента явилось изучение влияния адаптогена животного происхождения на лимфоидные органы (тимус, селезенка) и гистофункциональное состояния надпочечников в условиях холодовой нагрузки.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводили на 60 белых беспородных крысах-самках массой 180–220 г, содержащихся в виварии при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище, в осеннее-зимний пе-

риод. Подопытные животные были разделены на 5 групп: 1 – интактные; 2 – интактные + острый стресс (контроль); 3 – экспериментальные животные, получавшие, ГКЯ в виде одной ежедневной добавки к основному корму в количестве 3 мл/кг + острый стресс; 4 – интактные + стресс 12 дней (контроль); 5 – экспериментальные животные, получавшие ГКЯ + стресс 12 дней. Эксперименты выполнены с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Холодовой стресс моделировали опусканием животных в холодную воду при температуре 6 ± 1 °С в течение часа однократно или многократно (до 12 дней по 1 разу в день).

В настоящей работе исследовали эффект ГКЯ на стадии тревоги (однократное пребывание в воде) и стадии истощения (12 дней стресс – воздействия). После легкого эфирного наркоза крыс декапитировали с одномоментным забором крови для определения уровня кортизола в сыворотке крови. Для оценки стрессорного воздействия проводили определение массы крыс, массы лимфоидных органов (тимуса, селезенки), надпочечников, оценивали состояние слизистой оболочки желудка. Для приготовления гистологических препаратов использовали правый надпочечник. Его извлекали тотчас после забоя, фиксировали в жидкости Карнуа. Депарафинированные срезы органа толщиной 7 мкм для оценки морфологической картины окрашивали по общепринятой методике гематоксилином и эозином. В замороженных срезах надпочечника, полученных на микротом-криостате МК-25, выявляли содержание нейтральных жиров жировым красным О. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости меньше 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Одной из важнейших регуляторных систем в организме является иммунная система, она играет важнейшую роль в поддержании гомеостаза организма. Тимус и другие лимфоидные органы очень быстро реагируют на стрессорное повреждение [3]. Установлено, что острое холодовое воздействие сопровождается развитием комплекса дистрофических изменений внутренних органов, характерных для стрессорной реакции: гипертрофией надпочечников (НП), инволюцией тимуса, появлением язвенных повреждений желудка [1].

На первые сутки после воздействия холодового фактора наиболее ярко реагировала на стресс вилочковая железа. У стрессированных животных отметили уменьшение массы тимуса на 12,6 % и умеренное снижение масса селезенки на 6,0 %, абсолютная масса надпочечников не изменилась (табл. 1), но достоверно увеличилась относительная масса надпочечников на фоне некоторого снижения массы тела животных. Относительная масса НП составила 15,6 ± 0,29 мг/100г при массе тела 178,2 ± 3,9.

Одновременно с уменьшением массы тимуса и селезенки отмечали появление гиперемии и единичные петехиальные кровоизлияния на слизистой оболочке желудка, что является одним из критериев проявлений стресса. Вместе с тем, уже на первые сутки стресса в группе крыс, не получавших пищевую добавку, погибли 12,5 % животных. У всех погибших животных регистрировали почти двухкратное снижение уровня кортизола в плазме крови (25,4 + 1,36 nmol/l).

У животных, подвергшихся острому стрессовому воздействию, наблюдали выраженную делипоидизация коркового вещества НП. Вся сетчатая зона, нижняя и средняя треть пучковой зоны были лишены липидов, местами делипоидизация распространялась вплоть до наружных отделов пучковой зоны (рис. 1). Уменьшение содержания липидов в коре надпочечника сопровождалось двухкратным повышением уровня кортизола в крови стресс – контрольных животных, что также свидетельствовало о повышении уровня их функционирования (85,7 ± 4,10 nmol/l), по сравнению с интактными животными (45 ± 1,83).

Влияние «Тингол-1» на выраженность катаболических повреждений органов у стресс – контрольных и стресс – экспериментальных животных при холодовом воздействии

Группы животных	Масса органов (мг) у половозрелых крыс		
	Надпочечники	Тимус	Селезенка
Стресс – контроль 1-ые сутки	27,9 ± 0,74	170,4 ± 10,39	634,7 ± 11,8
Стресс + ГКЯ 1-ые сутки	28,0 ± 0,81	185,3 ± 4,7	657,7 ± 12,9
Стресс – контроль 12-ые сутки	27,1 ± 0,1	135,4 ± 6,8	540,7 ± 11,4
Стресс + ГКЯ 12-ые сутки	34,0 ± 0,25*	195,1 ± 6,2*	623,2 ± 13,6*

Примечание. *– достоверность по отношению к стресс – контролю при $p < 0,05$.

Рис. 1. Уменьшение липидов в коре НП крыс 2-ой группы на первые сутки. Окр. Oil Red O, ув. х 100

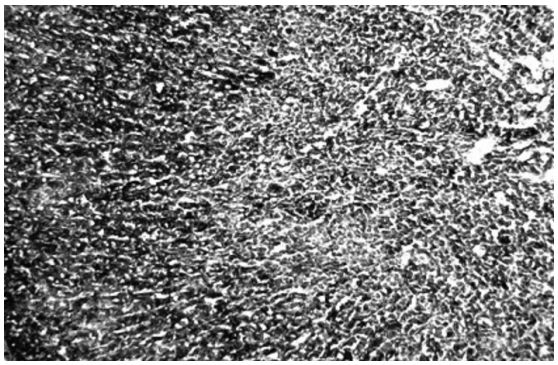

Рис. 2. Уменьшение липидов в коре НП крыс 3-ей группы на первые сутки. Окр. Oil Red O, ув. х 100

На 1 сутки у стресс – экспериментальных животных незначительно снижалась масса тимуса на 6,0%, что не имело достоверных отличий от стресс – контроля, масса селезенки и абсолютная масса надпочечников достоверно не менялись (таблица). В эксперименте у животных, получавших на фоне стресса ГКЯ, в первые сутки выявили тенденцию к увеличению относительной массы НП, но достоверных изменений по сравнению со стресс – контролем нет. У самок относительная масса НП составила 15,2 ± 1,02 мг/100 г при весе тела 184,2 ± 2,8 г. В итоге, тимус и селезенка у стрессируемых экспериментальных животных имели менее выраженные потери в весе, чем в стресс – контроле и изменения на слизистой оболочке желудка на 1 сутки стрессового воздействия не выявлялись. У животных, получавших ГКЯ, в НП не наблюдали тяжелых морфологических и, как следствие, функциональных нарушений. Последнее подтверждает уровень кортизола в крови стрессируемых животных, который составил 67,15 ± 3,32 nmol/l, $p < 0,05$. Отсутствие выраженного функционального напряжения при остром стрессе также подтверждалось меньшей степенью делипоидизации коркового вещества, нежели у стресс – контрольных животных, только сетчатая зона и нижняя треть пучковой зоны были лишены липидов (рис. 2).

Многократные стрессовые воздействия холодового фактора на протяжении 12 суток привели к угнетению функциональной активности тимуса и селезенки. На 12 сутки эксперимента в группе стресс – контроля отмечали резкое уменьшение массы тимуса на 30,7% (таблица). Продолжала снижаться масса селезенки, что явилось достоверным по отношению к интактным крысам. В слизистой оболочке желудка увеличилось число крупных кровоизлияний и появились новые изъязвления, что можно рассматривать как один из признаков перехода стадии резистентности стресс – реакции в стадию истощения. У крыс, подвергнутых холодовому стрессу, наблюдали задержку возрастного роста тела. Вес тела контрольных животных не имел прироста и уменьшился до 165,0 ± 1,9 г. Вес интактных животных составил на 12 сутки 201,5 ± 2,0 г. Холодовой стресс к 12 суткам опыта вызывал ослабление гипертрофии надпочечников. Абсолютная масса НП уменьшилась и не отличалась от интактных животных. Относительная масса надпочечников на фоне сниженного веса тела была достоверно увеличена и составила 16,3 ± 0,11 мг. Гормональными критериями фазы «максимального напряжения», что предшествует стадии истощения, на 12 сутки можно считать трехкратное повышение уровня кортизола у крыс в стресс – контроле (92,5 + 2,76 nmol/l), что согласуется с данными литературы [5].

Накопления липидов у стресс – контрольных животных к 12 суткам не происходило. В НП наблюдали полное отсутствие липидных капель в клубочковой и сетчатой зонах и только в средней трети пучковой зоны определялись мелкие слабовыраженные липидные капли (рис. 3).

Анализируя полученные данные, можно предположить, что к 12 суткам эксперимента у стресс – контрольных животных появились начальные признаки перехода стадии резистентности к стадии истощения. К этому времени из 32 крыс в группе стресс – контроля погибло 10 животных, что составило 31,2%. В группе крыс, получавших ГКЯ, гибели животных на первые сутки эксперимента не наблюдали.

На фоне приема ГКЯ к 12 суткам эксперимента наблюдали менее выраженное снижении массы тимуса и селезенки относительно стресс – контроля. Уменьшение массы тимуса составило 10,1%, что достоверно выше, чем в стресс – контроле. Мас-

са селезенки составила 623,2 ± 13,6 мг, что также достоверно выше, чем у стресс – контрольных животных (табл. 1). Слизистая оболочка желудка не имела патологических изъязвлений. Масса лимфоидных органов уменьшилась по сравнению с интактными животными, но была достоверно выше, чем в стресс – контроле, что в некоторой степени указывало на сохранение адаптивных возможностей лимфоидных органов при охлаждениях. Кроме этого, вес животных, получавших ГКЯ, был несколько выше, чем в стресс – контроле и составил 190,1 ± 1,6 г.

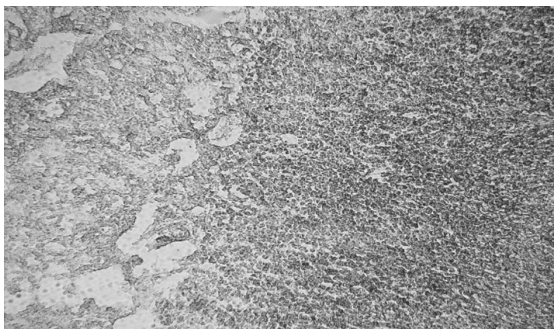

Рис. 3. Уменьшение липидов в коре НП крыс 4-ой группы на 12-ые сутки. Окр. Oil Red O, ув. х 100

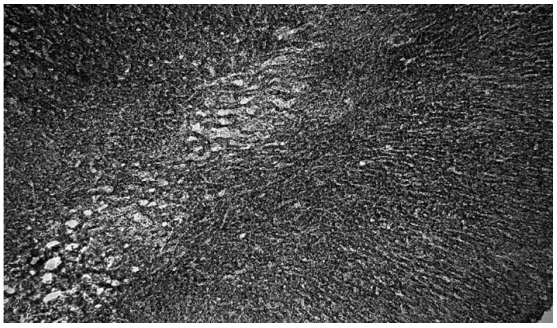

Рис. 4. Увеличение липидов в коре НП крыс 5-ей группы на 12-ые сутки. Окр. Oil Red O, ув. х 100

Получение животными биологической добавки, содержащей тритерпеновые гликозиды, оказывало заметное положительное действие на кору надпочечников. Относительная и абсолютная масса надпочечников достоверно выше, чем в стресс – контроле, что указывало на продолжение стадии резистентности. Относительная масса НП составила 17,8 ± 0,2 мг (увеличение на 20,2%). У экспериментальных животных уровень кортизола оказался более стабилен и достоверно ниже по сравнению со стресс – контролем (68,0 ± 1,50 nmol/l).

Гибель экспериментальных животных к окончанию эксперимента составила 8%, что значительно меньше, чем в контроле, где гибель крыс составила 32%. Получение крысами биологически активной добавки уменьшало выраженность морфологических изменений коры надпочечников. Содержание липидов в коре надпочечников нормализовалось и не отличалось от интактных животных (рис. 4). На основании полученных данных можно сказать, что к 12 суткам холодового воздействия у стресс – экспериментальных животных, получавших «Тингол-1», отмечали постепенное нарастание гипертрофии надпочечников, отсутствие потерь в весе тела, сохранение массы лимфоидных органов, что и привело к формированию более выраженной стадии резистентности.

Заключение

Проведенные нами исследования показали, что получение животными биологически активной добавки «Тингол-1» на фоне холодового воздействия не вызывает по сравнению с контролем акцидентальной инволюции тимуса, стабилизирует секреторную активность глюкокортикоидпродуцирующих клеток, а также способствует сохранению умеренной липидной насыщенности, что позволило установить стресс-корректирующее действие «Тингол-1».

Список литературы

1. Голуб И.Е., Лебединский В.Ю., Изатулин А.В. и др. Морфофункциональные изменения в надпочечниках экспериментальных животных при хроническом иммобилизационном стрессе // Современные наукоемкие технологии. – 2009. – № 9. – С. 82–84.

2. Зенкина В.Г., Каредина В.С., Солодкова О.А. Морфология яичников андрогенизированных крыс на фоне приема экстракта из кукумарии // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С. 70–72.

3. Иванова Н.К., Доншанова К.С., Шантанова Л.Н. Морфофункциональные изменения тимуса крыс при иммобилизационном стрессе и их коррекция фитосредством «Тантон» // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – № 2(66). – С. 260–261.

4. Кухаренко Н.С., Новоселова А.А. Коррекция хронического холодового стресса у крыс пробиотическим препаратом // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 7. – С. 110–112.

5. Полина Ю.В., Родзаевская Е.Б., Наумова Л.И. Уровень кортизола и морфология надпочечников под воздействием низкоинтенсивного электромагнитного излучения и при стрессе // Саратовский научно-медицинский Журнал. – 2008. – № 1. – С. 127–130.

6. Солодкова О.А., Зенкина В.Г., Каредина В.С. Влияние экстракта кукумарии японской на структуру надпочечников белых крыс при холодовом стрессе // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8. – С. 419–423.

7. Симонова Н.В., Доровских В.А., Ли О.Н. и др. Настой лекарственных растений и окислительный стресс в условиях холодового воздействия // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – № 48. – С. 76–80.

8. Ярыгина Е.Г., Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. Окислительный стресс и его коррекция карнозином // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 4. – С. 106–113.

9. Aminin D.L., Zaporozhets T.S., Andryjashchenko P.V. et al. Radioprotective properties of cumaside, a complex of triterpene glycosides from the sea cucumber Cucumaria japonica and cholesterol // Natural Product Communications. – 2011. – Vol. 6, № 5. – P. 587–592.

10. Pislyagin E.A., Gladkikh R.V., Kapustina I.I. et al. Interaction of holothurian triterpene glycoside with biomembranes of mouse immune cells // International Immunopharmacology. – 2012. – Vol. 14, № 1. – P. 1–8.