

На правах рукописи



ИВАНОВА ИННА КОНСТАНТИНОВНА

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
НАДПОЧЕЧНИКОВ, ТИМУСА И ЖЕЛУДКА БЕЛЫХ КРЫС
ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ
И ИХ КОРРЕКЦИЯ ФИТОСРЕДСТВОМ «ТАНТОН»**

16.00.02 - патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ - 2005

Работа выполнена в Институте общей и экспериментальной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Лоншакова Клара Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

профессор

Хибхенов Лопсон-Доржо Владимирович

кандидат биологических наук

Константинова Светлана Архиповна

Ведущая организация:

Восточно-Сибирский государственный
технологический университет

Защита состоится 15 июня 2005 года в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д-220.006.01 в ФГОУ ВПО «Бурятская
сельскохозяйственная академия им. профессора В.Р. Филиппова» (670024,
г. Улан-Удэ, ул. Пушкина, 8).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Бурятская
сельскохозяйственная академия им. профессора В.Р. Филиппова».

Автореферат разослан 14 мая 2005 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат ветеринарных наук, доцент



Игумнов Геннадий Александрович

2006-4
8389

2153826

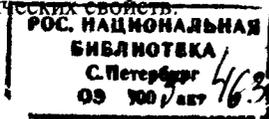
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время проблема повышения общей сопротивляемости организма приобрела особую актуальность в связи с прогрессирующим распространением хронического стресса у практически здоровых людей, вследствие расширения сфер профессиональной деятельности, загрязнения окружающей среды и отхода от традиционных условий быта (Фурдуй, 1990). К факторам риска можно отнести появление сложных видов трудовой деятельности, неизмеримо возросший темп жизни, особенно в городах, резкое повышение потока информации, избыточное потребление пищевых жиров, злоупотребление медикаментозными средствами, табаком и алкоголем, недостаток физической активности и т.д., каждый из которых в отдельности или в сочетании с другими порождает серьезные проблемы со здоровьем, вызывая нервно-психическое перенапряжение с развитием синдрома хронического стресса.

Одним из путей решения проблемы повышения неспецифической сопротивляемости организма человека является использование фармакологических средств - адаптогенов. Предпочтение отдается растительным препаратам ввиду их высокой эффективности, отсутствия токсичности и развития негативных реакций при длительном применении. Перспективным направлением представляется разработка многокомпонентных растительных препаратов, высокая фармакотерапевтическая эффективность которых обусловлена гармоничным сочетанием биологически активных веществ, оказывающих адекватное воздействие на основные звенья патологического процесса, а также осуществляющих коррекцию функционального состояния организма в целом.

В Отделе биологически активных веществ Института общей и экспериментальной биологии СО РАН разработано новое растительное средство в виде 40 % спиртового экстракта, состоящего из сырья следующих видов растений: аира болотного (корневища), бадана толстолистного (корневища и корни), боярышника кроваво-красного (плоды), девясила высокого (корневища и корни), имбиря аптечного (корни), календулы лекарственной (цветки), кардамона настоящего (плоды), крапивы двудомной (листья), пятилистика кустарникового (побеги), левзеи сафлоровидной (корневища с корнями), мускатного ореха (плоды), облепихи крушиновидной (плоды), перца черного (плоды), петрушки кудрявой (корни), пятилистика кустарникового (листья), родиолы розовой (корневища с корнями), солодки уральской (корни) и шиповника (плоды), условно названное «Тантон».

Высокая фармакотерапевтическая эффективность указанного многокомпонентного растительного средства достигается благодаря сочетанию целого комплекса биологически активных веществ, обуславливающего взаимное усиление их полезных фармакологических свойств.



Целью настоящего исследования явилось выявление особенностей морфофункциональных изменений надпочечников, тимуса и желудка при иммобилизационном стрессе и их коррекция растительным средством «Тантон».

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выяснить особенности морфофункционального состояния надпочечников, тимуса и желудка при иммобилизационном стрессе разной экспозиции;
- оценить влияние «Тантона» на морфофункциональное состояние надпочечников, тимуса и желудка на фоне иммобилизационного стресса;
- определить спектр адаптогенной активности «Тантона»;
- выяснить возможные механизмы адаптогенного действия «Тантона».

Научная новизна. Установлено, что иммобилизационный стресс индуцирует гипертрофию надпочечников, инволюцию тимуса и появление деструктивных повреждений в слизистой оболочке желудка белых крыс, коррелирующих по выраженности с продолжительностью стрессорного воздействия. Патоморфологические изменения в надпочечниках характеризовались гипертрофией преимущественно пучковой зоны коркового вещества. Также при иммобилизационном стрессе отмечалась массовая гибель Т-лимфоцитов и их выброс в кровеносное русло, что сопровождалось инволюцией тимуса. Основу морфологических изменений тканей желудка составляло сочетание некротических изменений слизистой оболочки, снижение функциональной активности желез и обильная воспалительная инфильтрация межучной ткани.

Установлено, что превентивное введение «Тантона» на фоне иммобилизационного стресса предупреждает развитие патоморфологических изменений надпочечников, тимуса и желудка белых крыс.

«Тантон» обладает выраженной адаптогенной активностью при экстремальных воздействиях различной природы: интенсивных физических нагрузках (динамических и статических), гипоксии (гипобарической, гемической и гистотоксической), интоксикации тетрахлорметаном.

Установлено, что широкий спектр адаптогенной активности испытуемого средства связан с формированием под его влиянием состояния неспецифически повышенной резистентности, обусловленного стабилизацией мембранных структур клеток. Молекулярно-клеточный механизм мембраностабилизирующего действия «Тантона» связан с ограничением окислительного стресса, обусловленного как ингибированием процессов перекисного окисления липидов, так и повышением мощности системы эндогенной

антиокислительной защиты организма при экстремальных воздействиях. Наряду с этим, испытуемое средство стимулирует процессы синтеза белка, а также способствует оптимизации энергетического обмена, поддерживая на более высоком уровне процессы энергообеспечения структур, ответственных за реализацию адаптивных реакций организма.

Практическая значимость. Материалы исследований включены в отчет по доклиническому изучению «Тантона», рекомендованного в качестве биологически активной добавки (БАД) для повышения неспецифической резистентности организма.

Материалы диссертационной работы включены в методические рекомендации для студентов «Оптимизация адаптивных реакций организма» и используются в процессе преподавания курсов фармакологии, фитотерапии и традиционной медицины на кафедрах медицинского факультета Бурятского государственного университета МО РФ.

По материалам проведенных исследований получен патент на изобретение лекарственного средства, обладающего адаптогенной активностью.

Основные положения, выносимые на защиту:

- иммобилизационный стресс вызывает морфофункциональные изменения надпочечников, тимуса и слизистой оболочки стенки желудка белых крыс в условиях иммобилизационного стресса;

- растительное средство «Тантон» оказывает выраженное стресс-протективное действие при иммобилизационном стрессе, снижая выраженность патоморфологических изменений надпочечников, тимуса и желудка белых крыс;

- «Тантон» оказывает выраженное адаптогенное действие, повышая неспецифическую резистентность организма к действию стрессорных факторов различной природы;

- базисным молекулярно-клеточным механизмом адаптогенного действия «Тантона» является его способность ингибировать процессы перекисного окисления липидов и тем самым стабилизировать мембранные структуры клеток при экстремальных воздействиях различной природы;

- адаптогенный эффект испытуемого средства обусловлен также оптимизацией процессов энергообмена и активацией синтеза белка.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на:

- научно-практической конференции "Биологически активные добавки в профилактической и клинической медицине" (Улан-Удэ, 2001);

- ежегодной научно-практической конференции Бурятского государственного университета (Улан-Удэ, 2001, 2002);

- юбилейной конференции РОО «Фитотерапевтическое общество» (М, 2002);

- IX Российском Национальном конгрессе “Человек и лекарство” (М., 2002);

- 5 конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (М., 2002);

- X Российском Национальном конгрессе “Человек и лекарство” (М., 2003);

- научно-практической конференции “Биологически активные добавки в профилактической и клинической медицине” (Улан-Удэ, 2003);

- ежегодных научных сессиях Восточно-Сибирского Государственного технологического университета по секции “Химия биологически активных веществ” (Улан-Удэ, 2004).

Диссертация выполнена в лаборатории безопасности биологически активных веществ Отдела биологически активных веществ Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук и в соответствии с программой и планом научно-исследовательских работ (№ гос. рег. 01.9.40003183) по теме: «Создание информационного банка данных по тибетской медицине и разработка новых лекарственных препаратов», утвержденной 06.12.95 года Президиумом СО РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 160 страницах компьютерного текста и состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы, включающего 253 источника, из которых 48 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 50 микрофотографиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованию подвергался 40% спиртовой экстракт из сырья следующих видов растений: аира болотного, бадана толстолистного, боярышника кроваво-красного, девясила высокого, имбиря аптечного, календулы лекарственной, кардамона насоящего, крапивы двудомной, пятилистника кустарникового, левзеи сафлоровидной, мускатного ореха, облепихи крушиновидной, перца черного, петрушки кудрявой, родиолы розовой, солодки уральской и шиповника. В качестве препарата сравнения использовали экстракт элеутерококка жидкий в объеме 3,0 мл/кг массы крысы, обладающий наиболее выраженным адаптогенным эффектом (Дардымов, 1976) Перед экспериментами с целью исключения влияния этанола «Тантон» и экстракт элеутерококка деалкоголизировали путем выпаривания на водяной бане до 1/10 от исходного объема. Полученный остаток доводили дистиллированной водой до заданного объема в соответствии с рекомендациями (Правила...1992).

Эксперименты выполнены на 550 белых крысах линии Вистар обоего пола массой 160-200 г, 40 белых беспородных мышах и 60 мышах линии F₁ (СВАХС57В1/6) массой 18-20 г обоего пола. Животных содержали в стандартных условиях содержания в виварии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН при одинаковом уходе и питании со свободным доступом к воде. Экспериментальные исследования проведены при соблюдении правил, сформулированных в Приложении к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.77 г. Эвтаназию животных осуществляли методом мгновенной декапитации под легким эфирным наркозом.

Модель иммобилизационного стресса воспроизводили общепринятым методом путем фиксации животных в положении лежа на спине в течение 6, 12 и 24 ч (Юматов, Скоцеляс, 1979). «Тантон» вводили внутривенно в объеме 3,0 мл/кг многократно в течение 7 дней 1 раз в день за 1 ч до приема пищи. Животным контрольной группы вводили в эквивалентном объеме дистиллированную воду по аналогичной схеме. На 8-е сутки эксперимента крыс подвергали иммобилизационному стрессу, после чего животных декапитировали под легким эфирным наркозом и определяли выраженность деструктивных повреждений в слизистой оболочке желудка. Для этого желудок разрезали по большой кривизне и подсчитывали количество деструкций, которые подразделяли на точечные кровоизлияния и эрозии. Для каждого вида повреждений подсчитывали «индекс Паулса» по формуле (Амосова и соавт., 1998): $ИП = A \times B / 100$,

где: А - среднее количество деструкций в группе;

В - процент животных с повреждениями в группе.

Для оценки морфофункционального состояния надпочечников, тимуса и желудка подопытных животных использовали ряд гистологических, гистохимических и гистоэнзимологических методов. Органы для исследования извлекали сразу после стрессорного воздействия. Материал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина с последующей стандартной спиртовой проводкой и заливкой в парафин по общепринятой методике. Из парафиновых блоков готовили на санном микротоме гистологические срезы толщиной 4-6 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином (Меркулов, 1969; Волкова, Елецкий, 1982; Елисеев и соавт., 1967).

Для гистохимических и гистоэнзимологических методов исследования готовили свежемороженые срезы на микротом-криостате МК-25. Свежемороженые срезы окрашивали на содержание липидов суданом черным «В» по Беренбауму, активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) выявляли по Нахласу, содержание ШИК-реактивных веществ - ШИК-реакцией, тучные клетки и гликопротеины - толуидиновым синним.

Морфометрическое исследование органов проводили на микроскопе «Motic».

Для оценки спектра адаптогенной активности и механизма действия «Тантона» были использованы наиболее адекватные модели и информативные методы исследования, позволяющие объективно оценить особенности адаптогенной перестройки организма животных, происходящей под влиянием испытываемого средства.

Динамические физические нагрузки моделировали общепринятыми методами путем принудительного бега животных в 5-дорожечном трекбанде, снабженном электростимулятором (70 В), при скорости движения полотна 40 м/мин, а также плавания с 7 % грузом в бассейне с температурой воды $20,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Методические рекомендации..., 1999). Силовые физические нагрузки воспроизводили по методу С.Я. Арбузова (1960) путем виса животных на шесте.

Острую гипобарическую гипоксию воспроизводили в барокамерной установке, в которой с помощью масляного насоса создавали разрежение воздуха, соответствующее «подъему» животных на высоту 11000 м (Березовский, 1985). «Подъем» осуществляли со скоростью 20 м/мин.

Модель острой гистотоксической гипоксии создавали путем однократного внутрибрюшинного введения натрия нитропруссида в дозе 25 мг/кг (Караев и соавт., 1989).

Модель острой гемической гипоксии воспроизводили путем однократного внутрибрюшинного введения животным водного раствора натрия нитрита в дозе 70 мг/кг (Костюченков, Фаращук, 1982).

Интотоксикацию тетрахлорметаном осуществляли путем его внутрибрюшинного введения в виде 50 % масляного раствора в дозах Д₁₆, Д₅₀, Д₈₄ (Беленький, 1963).

Определение мембраностабилизирующей активности испытываемого средства осуществляли по степени перекисного и осмотического гемолиза эритроцитов (Ковалев и соавт., 1986).

Определяли также уровень Fe²⁺-индуцированной хемилюминесценции суспензии липосом куриного желтка с использованием хемилюминометра «PXL-01» (Россия) по методу (Клебанов и соавт., 1988).

Для оценки влияния средства на процессы синтеза в гомогенатах тканей определяли концентрацию общего белка (Lowry, 1951), нуклеиновых кислот (Трудолобова, 1977), гликогена (Seifter, 1950).

Оценку фармакотерапевтической эффективности испытываемого средства проводили с использованием моделей длительных физических нагрузок, иммобилизационного стресса и азатиоприновой иммуносупрессии.

Действие физических нагрузок воспроизводили общепринятым методом путем плавания животных с 7 % грузом в бассейне при температуре воды 25°C , после чего определяли общую физическую выносливость по продолжительности плавания до полного утомления, а также определяли

показатели, характеризующие состояние энергетических процессов и антиокислительной системы организма лабораторных животных. О влиянии испытуемого средства на энергетические процессы судили по содержанию АТФ (Алейникова, Рубцова, 1988), концентрации пировиноградной и молочной кислот с вычислением окислительно-восстановительного потенциала (Колб, Камышников, 1980) и концентрации гликогена в печени (Seifter, 1950).

Иммунодефицитное состояние воспроизводили путем внутрижелудочного введения азатиоприна в дозе 50мг/кг (Лазарева, Алехин, 1985). При исследовании иммуномодулирующей активности «Тантона» состояние гуморального иммунитета оценивали методом локального гемолиза (Cunningham, 1965); состояние клеточного иммунитета оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ (Петров и соавт., 1987); состояние макрофагального звена иммунного ответа оценивали в реакции фагоцитоза перитонеальных макрофагов мышшей в отношении *staphylococcus aureus in vitro* (Фрейдлин, 1976).

Для оценки антиоксидантной активности определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови (Osakava, Matshushita, 1980). О состоянии антиоксидантной системы судили по активности супероксиддисмутазы (СОД) (Чевари и соавт., 1985), каталазы (Королюк и соавт., 1988), содержанию восстановленного глутатиона (Beutler и соавт., 1963).

Полученные цифровые данные обработаны статистически с использованием U -критерия Уилкоксона-Манна-Уитни (Сергиенко, Бондарева, 2000). Различия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфофункциональные изменения надпочечников при иммобилизационном стрессе и их коррекция фитосредством «Тантон»

Надпочечники входят в состав гипоталамо-гипофизарно-адренортикаральной системы (ГГАС), играющей важную роль в адаптации организма к изменениям среды. Центральное место в изменениях, происходящих при остром стрессе на структурном уровне, занимает гипертрофия надпочечников.

Результаты морфометрического анализа показали, что в результате 6-часового иммобилизационного стресса ширина пучковой зоны увеличилась на 13 %, в то время как клубочковая и сетчатая зоны коры при этом воздействии оставались относительно интактными (табл. 1).

При этом наблюдалось разрыхление соединительно-тканых волокон капсулы с плазматическим пропитыванием и набуханием, полнокровие

всех звеньев кровеносного русла, значительные дистрофические изменения, вакуолизация и дисконфлексация клеток пучковой зоны.

При оценке морфологических критериев состояния функциональной активности надпочечников степень насыщения коры липидами имеет существенное значение. Окраска на липиды выявила значительное их уменьшение во всех зонах коркового вещества.

Профилактическое 7-дневное введение «Тантона» в экспериментально-терапевтической дозе 3,0 мл/кг препятствовало выраженности морфологических изменений органа под влиянием стрессорного воздействия. В капсуле в ряде случаев наблюдалась нерезко выраженная дисориентация соединительнотканых волокон, небольшие очаги их плазматического пропитывания. Клетки клубочковой зоны сохраняли аркадообразную группировку. Эндокриноциты располагались между сосудами, имеющими обычное строение.

При 12-часовом иммобилизационном стрессе гипертрофии подвергались пучковая и сетчатая зоны коры надпочечника, о чем свидетельствует увеличение этих зон соответственно на 20 и 17 % по сравнению с интактной группой животных (табл. 1).

Гипертрофия, в основном, осуществлялась за счет усиления кровенаполнения, отека и увеличения паренхиматозной массы коркового вещества.

Окраска срезов надпочечников на жиры выявляла во всех сериях опытов однотипную картину, свидетельствующую о значительном снижении содержания липидов в результате стрессорного воздействия.

Профилактическое введение «Тантона» в объеме 3,0 мл/кг при 12-часовой иммобилизации оказывало выраженное антистрессорное действие. Так, ширина пучковой и сетчатой зон коры надпочечников была соответственно на 8 и 17 % меньше аналогичных показателей крыс контрольной группы (табл. 1).

При 24-часовом иммобилизационном стрессе в надпочечниках крыс наблюдали дальнейшую гипертрофию корковой зоны. Границы перехода одной зоны в другую становятся трудно различимыми. При этом ширина пучковой и сетчатой зон увеличилась соответственно в среднем на 30 и 23 % по сравнению с таковыми в контрольной группе животных.

В пучковой и сетчатой зонах наряду с дистрофическими изменениями наблюдалась картина, характерная для стресс-реакции, главным образом, в виде очагового или полного исчезновения липидов. Морфология сетчатой зоны при 24-часовом иммобилизационном стрессе отличалась выраженной разреженностью клеток.

Анализ гистологических препаратов при введении «Тантона» на фоне 24-часового иммобилизационного стресса показал, что в коре сохранилось разделение клеток на зоны. Сетчатая зона выглядела несколько расширен-

ной и разрыхленной за счет полнокровия капилляров. Несмотря на то, что насыщенность липидами носила разреженный характер, ее величина превышала таковую у животных контрольной группы

Таблица 1.

Влияние иммобилизационного стресса на морфометрические параметры коры надпочечников белых крыс и их коррекция фитосредством «Тантон»

Группы животных	n	Клубочковая зона, мкм	Пучковая зона, мкм	Сетчатая зона, мкм
Интактная	10	38,6±2,4	354,5±15,3	228,6±10,5
6-часовая иммобилизация				
Контрольная (стресс+H ₂ O)	10	40,2±2,9	400,9±21,2**	234,3±17,8
Опытная 1 (стресс+Тантон)	10	39,0±1,9	362,6±12,9	231,7±15,4
Опытная 2 (стресс+элютероккок)	10	39,2±2,4	370,8±17,	231,7±11,5
12-часовая иммобилизация				
Контрольная (стресс+H ₂ O)	10	41,2±2,2	420,6±20,6**	280,4±14,4**
Опытная 1 (стресс+Тантон)	10	39,0±3,0	390,0±17,3*	239,6±18,6*
Опытная 2 (стресс+элютероккок)	10	39,4±2,7	390,3±22,9*	250,2±12,2*
24-часовая иммобилизация				
Контрольная (стресс+H ₂ O)	10	42,0±2,1	460,7±18,6**	282,0±17,5**
Опытная 1 (стресс+Тантон)	10	39,6±1,6	418,0±16,3*	243,0±13,4*
Опытная 2 (стресс+элютероккок)	10	39,0±2,3	425,2±19,8*	240,6±19,7*

Примечание: Здесь и далее: * - значения достоверны по сравнению с данными у животных контрольной группы при $P \leq 0,05$; ** - значения достоверны по сравнению с данными у животных интактной группы при $P \leq 0,05$.

Таким образом, при сравнительно непродолжительном стрессорном воздействии (6, 12 и 24 часа) наблюдали изменения паренхимы надпочечников у крыс. Структурные нарушения сопровождались дистрофическими изменениями и дискомплексацией, обеднением клеток коры липидами. Все это свидетельствовало об угнетении функциональной активности надпочечников. При введении растительного средства «Тантон» на фоне имму-

изменениями и дискомплексацией, обеднением клеток коры липидами. Все это свидетельствовало об угнетении функциональной активности надпочечников. При введении растительного средства «Тантон» на фоне иммобилизационного стресса у крыс не было отмечено выраженных структурных изменений в зонах коры надпочечников, а явления полнокровия и умеренной липидной насыщенности свидетельствовали о сохранившихся функциях коркового вещества.

Морфофункциональные изменения тимуса при иммобилизационном стрессе и их коррекция фитосредством «Тантон»

Увеличение в организме количества гормонов коры надпочечников, в первую очередь глюкокортикоидов, вызывает очень быструю и сильную акцидентальную инволюцию тимуса. При стресс-реакции происходит выброс Т-лимфоцитов в кровь и массовая гибель лимфоцитов в самом органе, особенно в корковом веществе. Так, при 6-часовом стрессорном воздействии было выявлено уменьшение толщины коркового вещества тимуса белых крыс в 1,3 раза по сравнению с таковой у животных интактной группы (рис. 1), величина этого показателя составляла 260 мкм, при размахе колебаний – от 200 до 290 мкм.

Площадь мозгового вещества в тимусе крыс после стрессорного воздействия, наоборот, увеличилась в 1,2 раза (рис. 2) и составляла 940 мкм², размах колебаний варьировал от 840 до 1020 мкм².

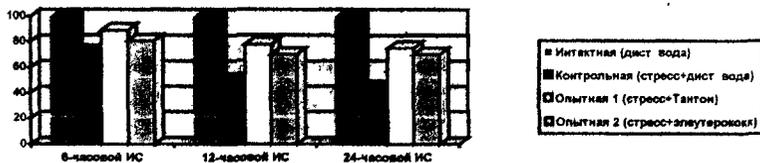


Рис. 1. Влияние иммобилизационного стресса на ширину коркового слоя тимуса крыс.

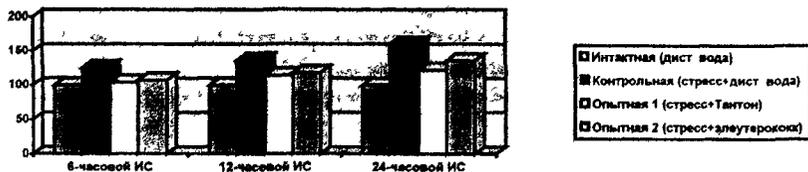


Рис. 2. Влияние иммобилизационного стресса на площадь мозгового вещества тимуса крыс.

Расширенная капсула неравномерно прилегала к долькам тимуса, соединительнотканнные волокна ее были расслоены и отечны. Междольковая соединительная ткань также выглядела утолщенной, отечной, инфильтрированной лимфоцитами. В междольковой соединительной ткани отмечалось незначительное количество тучных клеток. В мозговом слое наблюдали полнокровие синусов, капилляров, диапедезные кровоизлияния.

Применение «Тантона» на фоне 6-часового стресса оказывало модулирующее воздействие на морфологическую структуру тимуса. На гистологических препаратах капсула тимуса тонкая и на большем своем протяжении плотно прилегала к паренхиме органа, однако в некоторых местах она выглядела рыхлой и несколько отслаивалась. Наряду с этим, отмечалось умеренное полнокровие сосудов с отсутствием различного рода кровоизлияний. В корковом и мозговом слоях долек тимуса каких-либо изменений по сравнению с нормой не наблюдалось.

При 12-часовом иммобилизационном стрессе в тимусе животных отмечали резко выраженное полнокровие сосудов: стаз капилляров, обширные диапедезные кровоизлияния в мозговом веществе. В сосудах междольковой соединительной ткани наблюдались явления сладжа и лимфоидной инфильтрации. Кроме того, выявлялось большое количество тканевых базофилов, гомогенно-базофильно-окрашенных или с четко выраженной зернистостью, при этом отчетливо была видна дегрануляция тканевых базофилов.

Граница коркового вещества с мозговым слоем стала менее отчетливой. Результаты морфометрических анализов показали, что ширина коркового вещества уменьшилась в 2 раза (рис. 1) и составляла 180 мкм (размах колебаний – от 150 до 200 мкм). Площадь мозгового вещества составляла 1020 мкм, что в 1.4 раза больше по сравнению с аналогичным показателем крыс контрольной группы (рис. 2), данная величина варьировала от 970 до 1100 мкм. Сами дольки при этом уменьшались в размерах.

Превентивное введение «Тантона» на фоне 12-часовой иммобилизации снижало выраженность стрессорных повреждений тимуса испытываемых животных. Толщина капсулы несколько уменьшалась, хотя в большинстве случаев она выглядела рыхлой и отечной. В дольках сохранялся довольно широкий корковый слой. Границы между слоями четко выражены.

Ширина коркового вещества на 28% превышала таковую у крыс контрольной группы и составляла в среднем 280 мкм, при этом размах колебаний был от 210 до 390 мкм (рис. 1). Площадь мозгового вещества несколько уменьшалась и составляла 880 мкм², размах колебаний варьировал от 800 до 980 мкм² (рис. 2). Корово-медуллярная граница была более выраженной по сравнению с аналогичным показателем животных контрольной группы.

При 24-часовом иммобилизационном стрессе площадь мозгового вещества во всех долях увеличивалась. Корковое вещество в некоторых долях исчезало совсем, наблюдалась резко выраженная тучноклеточная реакция. Просвет артерий в паренхиме органа, в основном спавшийся, опустошенный. Вены, наоборот, расширены и полнокровны. В некоторых случаях отмечались разрывы стенок и выход форменных элементов в паренхиму долики тимуса. Вместе с тем в просветах капилляров наблюдалась агрегация эритроцитов. В мозговом веществе появились пустоты, свидетельствующие о некрозе лимфоцитов.

7-дневное введение «Тантона» снижало выраженность морфологических изменений органа под влиянием 24-часового стрессорного воздействия. В долях тимуса сохранялась корковая зона, а доля разрушенных клеток в мозговом веществе была незначительной. Изменения коснулись главным образом гемодинамики органа, особенно микроциркуляторного русла. В корковом и мозговом слоях переполненные кровью капилляры образовывали густую сеть. В паренхиме тимуса выявлялись мелкоочаговые кровоизлияния. В междольковой соединительной ткани также наблюдали кровенаполнение сосудов, выраженную лимфо-лейкоцитарную инфильтрацию, обилие тучных клеток.

Таким образом, в результате непрерывного иммобилизационного стресса, в структурно-функциональных компонентах тимуса подавляется лимфоцитопозитическая функция, увеличивается уровень процессов деструкции клеток. Проведенные нами исследования показали, что 7-дневное превентивное введение «Тантона» не вызывает выраженной по сравнению с контролем акцидентальной инволюции, тормозит процесс морфологических изменений в тимусе и тем самым способствует восстановлению структуры коркового и мозгового слоев тимуса.

Морфофункциональные изменения желудка крыс при иммобилизационном стрессе и их коррекция фитосредством «Тантон»

В настоящее время доказана роль стресса как главного или вспомогательного этиологического фактора язвенно-геморрагических поражений слизистой оболочки желудка.

Микроскопическое исследование стенки фундального отдела желудка при 6-часовом иммобилизационном стрессе показывало выраженное полнокровие капилляров слизистой оболочки, умеренный отек и инфильтрацию подслизистой основы, разволокнение мышечной и утолщение серозной оболочек. Капилляры образовывали густую сеть в собственно слизистой пластинке и окружали железы.

Превентивное введение «Тантона» уменьшало степень гемодинамических расстройств.

При 12-часовом стрессорном воздействии на гистологических срезах обнаруживались очаговые альтеративные поражения покровного эпителия, слизееобразование в дистрофически измененных клетках было ослаблено, при этом обилие мукоидных веществ иногда выявлялось на поверхности слизистой оболочки. Активность сукцинатдегидрогеназы в обкладочных клетках была снижена, в главных клетках уменьшалось количество рибонуклеопротеидов и белка. Кроме того, отмечались расстройства микроциркуляции, в собственном слое появлялись кровоизлияния, просветы сосудов расширялись.

Применение «Тантона» задерживало процессы деструкции клеток покровного эпителия. Наряду с этим, у крыс, принимавших «Тантон» на фоне 12-часового стресса наблюдалась более активная секреция ШИК-положительных веществ по сравнению с таковой у крыс контрольной группы. Введение испытуемого средства способствовало усилению функциональной активности слизистой оболочки желудка, о чем свидетельствовало значительное содержание зимогенных гранул в главных экзокриноцитах, а также более высокая активность сукцинатдегидрогеназы у животных опытной группы по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы.

Основу морфологических изменений при 24-часовом иммобилизационном стрессе составляло сочетание дегенеративных изменений железистых элементов, деструктивных процессов слизистой оболочки и обильная воспалительная инфильтрация межуточной ткани. Некоторые из клеток покровного эпителия утратили связь с базальной мембраной и слущивались в просвет желудка. Резко истончился слой ШИК-положительных веществ в супрануклеарных отделах сохранившихся эпителиоцитов. Усиление слущивания покровного эпителия приводило к образованию очаговых дефектов поверхностного эпителия – микроэрозий. Эпителию желез была свойственна дедифференцировка, нарушение выработки хлоридов и пепсина, что сопровождалось снижением активности реакций на сукцинатдегидрогеназу, развитием атрофических изменений в главных клетках. Воспалительная инфильтрация не ограничивалась поверхностными слоями слизистой оболочки, а распространялась к ее базальным отделам. В большом количестве обнаруживались тканевые базофилы. Дегенеративные изменения отмечены в области тела и концевых отделов желез.

Структурные изменения слизистой оболочки желудка крыс, принимавших «Тантон» отличались меньшей степенью интенсивности по сравнению с аналогичными показателями крыс контрольной группы. Превентивное введение испытуемого средства препятствует выраженности эрозивных повреждений слизистой оболочки желудка. Некоторые клетки же-

лез подвергались дистрофии, но без выраженной деструкции железистого компартмента в целом.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что «Тантон» в объеме 3,0 мл/кг обладает выраженным стресс-протективным действием, предотвращая развитие катаболических изменений в слизистой оболочке желудка белых крыс при иммобилизационном стрессе.

Исследование спектра адаптогенной активности «Тантона»

При исследовании влияния «Тантона» на физическую выносливость белых крыс и белых мышей выявлены дозо- и кратность-зависимые эффекты. Установлено, что наиболее выраженной актопротекторной активностью испытуемое средство обладает при введении в объеме 3,0 мл/кг; эффективность его повышается при многократном введении.

Установлено, что курсовое введение «Тантона» в объеме 3,0 мл/кг сопровождается повышением устойчивости животных к острой гипобарической, острой гистотоксической и гемической гипоксии. При этом антигипоксическая активность испытуемого средства была аналогичной таковой у препарата сравнения.

Результаты исследований показали, что «Тантон» оказывает выраженное антиоксическое действие, повышая выживаемость животных при интоксикации тетрахлорметаном.

Определение мембраностабилизирующей активности испытуемого средства показало, что «Тантон» вызывает уменьшение процента гемолиза эритроцитов, индуцированного добавлением в систему *in vitro* реактива Фентона, в среднем на 40 % по сравнению с показателями контрольных проб. При этом испытуемое средство на осмотический гемолиз не оказало существенного влияния.

Кроме того, «Тантон» оказывает выраженное ингибирующее влияние на кинетику Fe^{2+} - индуцированной хемилюминесценции суспензии липосом яичного желтка, о чем свидетельствует уменьшение амплитуды «быстрой вспышки», а также снижение скорости хемилюминесценции на начальной экспоненциальной стадии «быстрой вспышки».

Изучение анаболической активности «Тантона» показало, что длительное (21-дневное) введение испытуемого средства оказывает выраженное анаболическое и гонадотропное действие, ускоряя прирост мышечной массы и развитие придаточных половых желез у инфантильных белых крыс. Прирост массы тела неподозревших животных под влиянием длительного введения «Тантона» обусловлен активацией процессов синтеза белка, на что указывает достоверное повышение концентрации общего белка и РНК в гомогенате скелетной мышцы. Полученные данные свиде-

тельствуют о наличии у испытуемого средства выраженной анаболической активности.

Установлено, что интенсивная физическая нагрузка (плавание крыс с 7 %-ным грузом до полного утомления) сопровождается существенным снижением концентрации АТФ в скелетной мышце и повышением уровня молочной кислоты в сыворотке крови. Кроме того, на фоне интенсивной физической нагрузки наблюдалось истощение углеводных запасов, на что указывает снижение концентрации гликогена в печени. Превентивное 21-дневное введение «Тантона» оказывало выраженное актопротекторное действие, о чем свидетельствует повышение общей физической работоспособности животных опытной группы: продолжительность плавания увеличилась в среднем на 23 % по сравнению с данными животных контрольной группы. Анализ показателей энергетического обмена свидетельствует, что повышение физической выносливости животных под влиянием препарата обусловлено активацией ресинтеза АТФ: содержание ее в скелетной и сердечной мышцах было в среднем на 18 % выше по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. Наряду с этим, под влиянием испытуемого средства отмечалось повышение концентрации гликогена в печени на 23 %; снижение концентрации молочной кислоты (в среднем на 20 % по сравнению с контролем), сопровождаемое уменьшением коэффициента лактат/пируват на 23 %, что свидетельствует об активации процессов окислительного фосфорилирования.

Курсовое введение «Тантон» в объеме 3,0 мл/кг на фоне азатиоприновой иммуносупрессии оказывает выраженное протективное действие, предотвращая развитие иммунодефицитного состояния. Установлено, что испытуемое средство способствует активации всех звеньев иммунного ответа организма: гуморального, клеточного и макрофагального. При этом фармакотерапевтическая эффективность «Тантона» по ряду показателей превосходит таковую у препарата сравнения.

Проведенные нами исследования свидетельствуют, что иммобилизация продолжительностью 12 часов вызывает у крыс контрольной группы повышение концентрации МДА в 3 раза и значительное снижение активности ферментов антиоксидантной защиты: СОД и каталазы по сравнению с аналогичными данными интактных животных. Превентивное введение испытуемого средства оказывало выраженное антиоксидантное действие, о чем свидетельствует снижение концентрации МДА на 25 % по сравнению с контролем, увеличение содержания восстановленного глутатиона в сыворотке крови, а также повышение активности каталазы и супероксиддисмутазы соответственно на 38 и 56 % по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. При этом антиоксидантная активность «Тантона» была аналогичной таковой у препарата сравнения.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что профилактическое введение «Тантона» в объеме 3,0 мл/кг на фоне 12-часового иммобилизационного стресса оказывает выраженное антистрессорное действие, уменьшая выраженность дегенеративных катаболических изменений во внутренних органах белых крыс. Кроме того, испытываемое средство уменьшает интенсивность процессов перекисного окисления липидов и предупреждает истощение эндогенных антиоксидантных систем организма. Можно полагать, что протекторное действие испытываемого растительного средства связано с наличием в его составе биологически активных веществ фенольной природы (дубильных веществ, флавоноидов и др.), обладающих, как известно, выраженной антиокислительной и мембраностабилизирующей активностью (Барабой, 1993)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизационный стресс вызывает нарушения морфофункционального состояния надпочечников, тимуса и желудка, что выражается в изменении структуры вышеперечисленных органов, активации процессов ПОЛ и снижении активности эндогенной антиоксидантной системы. При этом морфофункциональные изменения коррелируют с продолжительностью стрессорного воздействия.

Профилактическое курсовое введение «Тантона» предупреждает развитие патологических изменений во внутренних органах и тканях животных при иммобилизационном стрессе, что связано, очевидно, с оптимизацией баланса стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем организма.

Растительное средство «Тантон» в объеме 3,0 мл/кг, соответствующем экспериментально-терапевтической дозе, повышает сопротивляемость организма лабораторных животных к действию стрессорных факторов различной природы (интенсивным физическим нагрузкам, гипоксии, иммобилизационному стрессу, интоксикации тетрахлорметаном). Эффективность испытываемого средства по ряду параметров превосходит таковую у препарата сравнения – экстракта элеутерококка.

Установлено также, что курсовое введение «Тантона» на фоне иммунодепрессивного состояния оказывает выраженное иммуномодулирующее действие, стимулируя клеточное, гуморальное и макрофагальное звенья иммунного ответа организма.

Широкий спектр адаптогенной активности «Тантона» связан с формированием под его влиянием состояния неспецифически повышенной резистентности, обусловленного стабилизацией мембранных структур клеток под его влиянием. Установлено, что молекулярно-клеточный механизм

мембраностабилизирующего действия испытуемого средства связан с ограничением окислительного стресса, ведущего к деструкции мембранных структур клеток. При этом, его антиоксидантная активность обусловлена как ингибированием процессов перекисного окисления липидов, так и повышением мощности системы эндогенной антиокислительной защиты организма при экстремальных воздействиях. Наряду с этим испытуемое средство стимулирует процессы синтеза белка, обусловленные активацией репликации рибонуклеиновой кислоты, а также способствует оптимизации энергетического обмена, поддерживая на более высоком уровне процессы энергообеспечения структур, ответственных за реализацию адаптивных реакций организма.

ВЫВОДЫ:

1. Иммобилизационный стресс разной экспозиции вызывает морфофункциональные изменения надпочечников, тимуса и желудка, и сопровождается индукцией перекисного окисления липидов и угнетением эндогенной антиоксидантной системы.
2. Растительное средство «Тантон» оказывает корректирующее влияние на морфофункциональное состояние надпочечника, тимуса и желудка при иммобилизационном стрессе.
3. Растительное средство «Тантон» оказывает выраженное адаптогенное действие, повышая неспецифическую резистентность организма к действию стрессорных факторов различной природы.
4. Базисным молекулярно-клеточным механизмом стресс-протективного действия «Тантона» является его способность ингибировать процессы перекисного окисления липидов и тем самым стабилизировать мембранные структуры клеток при экстремальных воздействиях различной природы.

Практические рекомендации

Выраженные адаптогенные свойства «Тантона» аргументируют целесообразность его внедрения в клиническую практику для повышения работоспособности, предупреждения утомления при повышенных психических и физических нагрузках у практически здоровых лиц, а также работающих на производстве с вредными условиями труда; для повышения сопротивляемости инфекциям, при астенических состояниях, а также в период реабилитации после перенесенных тяжелых заболеваний.

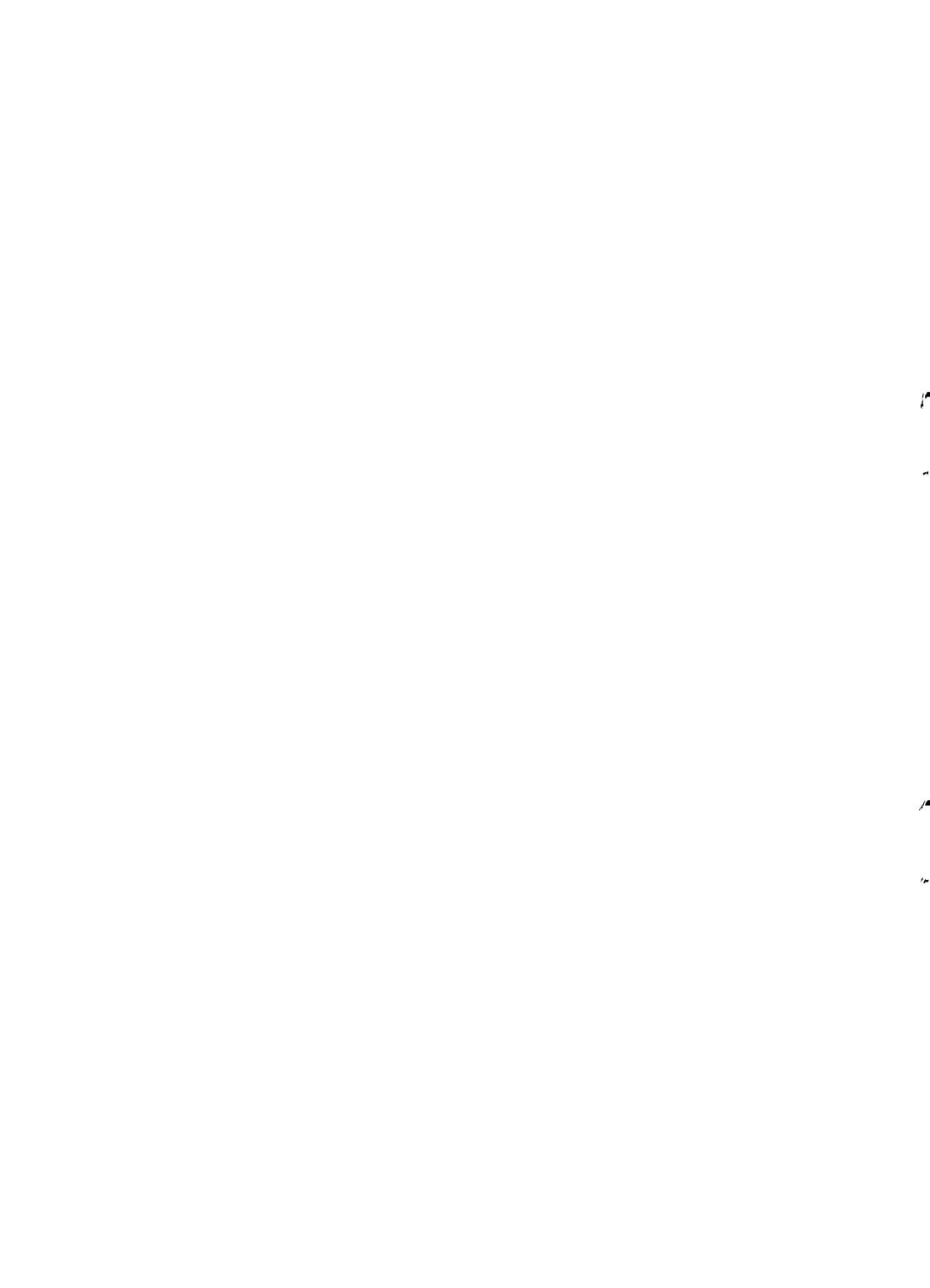
Список опубликованных работ

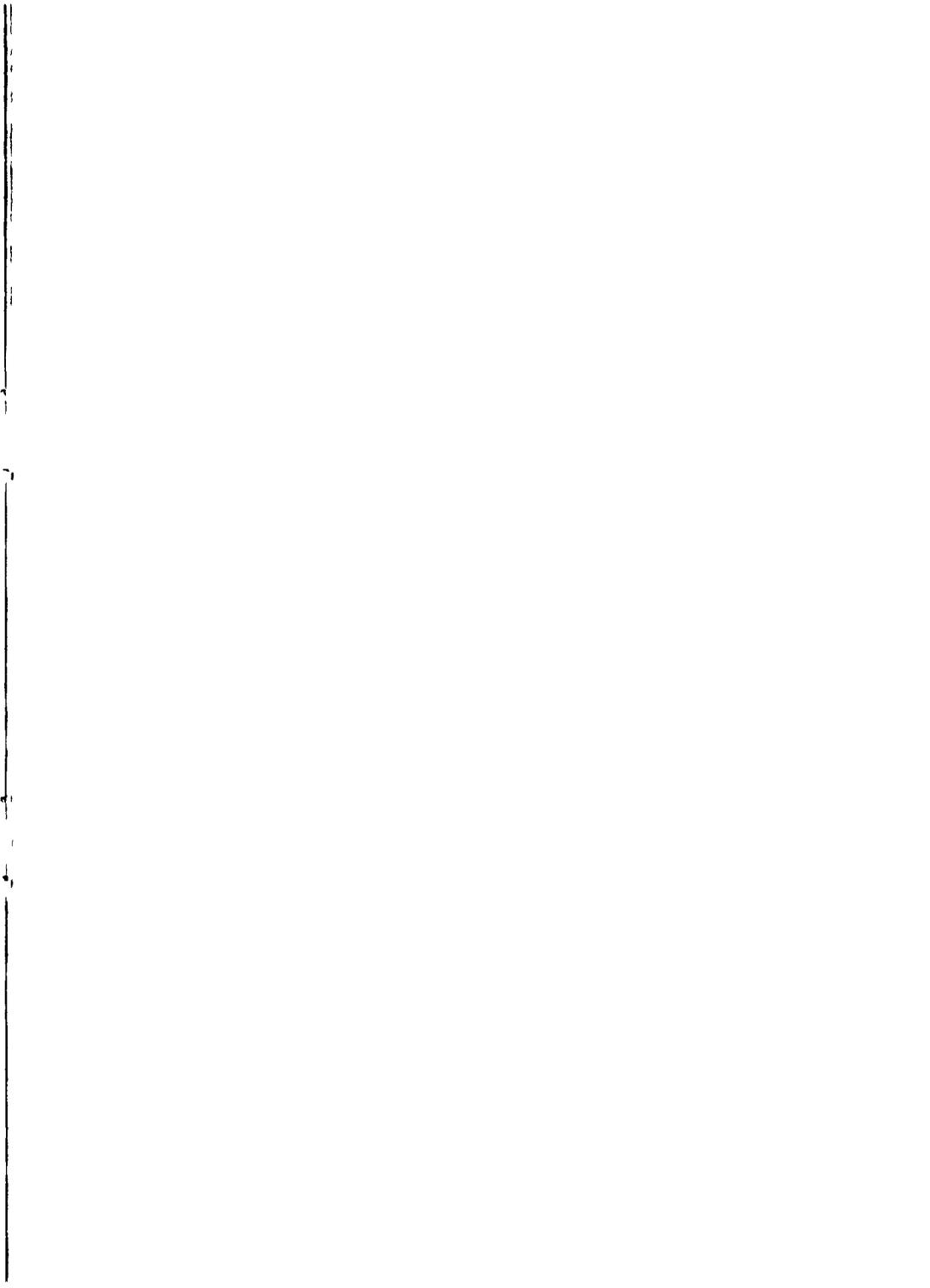
1. Иванова И.К., Шантанова Л.Н. Антиоксидантная активность «Тантона» // Сборник статей «Вестник БГУ» - Серия «Медицина» - Улан-Удэ, 2001 – С. 55-56.

2. Николаев С.М., Хобракова В.Б., Мондодоев А.Г., Абгалдаева Е.А., Петунова А.Н., Иванова И.К., Юндунова О.В. Иммуномодулирующее действие многокомпонентных фитосредств в условиях вторичного иммунодефицита // Мат-лы юбилейной конф. РОО «Фитотерапевтическое общество». – М. – 2002. – С. 9-12.
3. Иванова И.К., Шантанова Л.Н. Влияние эликсира "Тантон" на устойчивость к тканевой гипоксии. Материалы научно-практич. конф. "Биологически активные добавки в профилактической и клинической медицине". - Улан-Удэ, 2001. - С. 25-26.
4. Иванова И.К., Шантанова Л.Н. Влияние растительного комплексного средства «Тантон» на физическую работоспособность. // Тез. докл. IX Росс. национ. конгресса "Человек и лекарство". – 8-12 апреля. – М., 2002. – С. 619-620.
5. Николаев С.М., Хобракова В.Б., Петунова А.Н., Иванова И.К., Юндунова О.В., Шантанова Л.Н., Ажунова Т.А. Иммунокорректирующие свойства многокомпонентных растительных средств тибетской медицины // Мат-лы 5 Конгресса «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». – М., 2002. – Т. 2. - С. 373.
6. Шантанова Л.Н. Иванова И.К., Петунова А.Н. Антистрессорная активность тибетских лекарственных средств // Тез. докл. X Росс. национ. конгресса "Человек и лекарство". – 8-12 апреля. – М., 2003. – С. 685-686.
7. Хобракова В.Б., Петунова А.Н., Иванова И.К. // Влияние многокомпонентных фитосредств «Пять корней» и «Тантон» на состояние макрофагального звена иммунного ответа // Тез. докл. X Росс. национ. конгресса "Человек и лекарство". – 8-12 апреля. – М., 2003. – С. 679-680.
8. Иванова И.К., Шантанова Л.Н. Антиоксидантный эффект "Тантона" при иммобилизационном стрессе. // Тез. докл. X Росс. национ. конгресса "Человек и лекарство". – 8-12 апреля. – М., 2003. - С. 132-133.
9. Баханова Е.М., Парьева К.В., Иванова И.К., Шантанова Л.Н. Влияние эликсира "Тантон" на физическую работоспособность спортсменов. Сб. статей "80 лет на страже здоровья". - Улан-Удэ: Изд-во БГУ, 2003. - С. 127-128.
10. Иванова И.К., Шантанова Л.Н. Влияние эликсира "Тантон" на устойчивость к гипобарической гипоксии. Материалы научно-практич. конф. "Биологически активные добавки в профилактической и клинической медицине". - Улан-Удэ, 2003. - С. 87-88.
11. Петунова А.Н., Иванова И.К., Хобракова В.Б., Шантанова Л.Н. Иммуномодулирующие свойства растительных средств «Пять корней» и «Тантон» // Сборник трудов ВСГТУ. Серия: «Химия и биологически активные вещества» – Улан-Удэ, 2004. – С. 97-100.

Подписано в печать 17.05.2005 г. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Объем 1,25 печ.л. Тираж 100. Заказ №60.

Отпечатано в типографии Изд-ва БНЦ СО РАН
670047 Г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой 6.





№ 1 1 5 7 1

РНБ Русский фонд

2006-4

8389