

УДК 6.6-003.725:593.96]:616.45-085.252.453

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА КУКУМАРИИ ЯПОНСКОЙ НА СТРУКТУРУ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

Солодкова О.А., Зенкина В.Г., Каредина В.С.

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

Надпочечники являются одним из ведущих звеньев гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной 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. В настоящей работе исследовали влияние экстракта из кукумарии японской на развитие реакции стресса. Экстракт оказывает адаптогенное действие на течение стресс-реакции, что сопровождается менее выраженными колебаниями основных количественных параметров функциональных элементов коры надпочечника, а также способствует стабилизации уровня кортизола в крови, ограничению стрессовой реакции в стадии тревоги, формированию более выраженной стадии резистентности и задержке наступления стадии истощения общего адаптационного синдрома. Таким образом, сохраняя резервные возможности секреторных клеток, экстракт из кукумарии японской повышает устойчивость коры надпочечника к действию экстремальных факторов.

Ключевые слова: стресс, кукумария, надпочечник

EFFECTS EXTRACT OF CUCUMARIA JAPONICA ON STRUCTURE ADRENAL GLANDS WHITE RATS AT COLD STRESS

Solodkova O.A., Zenkina V.G., Karedina V.S.

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

The adrenal glands are one of the leading parts of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system, responsible for the maintenance of homeostasis in various environments. The functional state of the adrenal glands has a significant impact on the adaptive response of the body, due to extreme diversity of their roles and participation in the regulation of all forms of exchange. In this paper we investigated the effect of the Japanese sea cucumber extract on the development of the stress response. The extract has an adaptogenic effect on the course of the stress response, accompanied by a less pronounced fluctuations in the main quantitative parameters of the functional elements of the adrenal cortex, as well as helps stabilize the level of cortisol in the blood, control the stress response in the stage of anxiety, a more severe stage of resistance and delay the onset of exhaustion general adaptation syndrome. Keeping the spare capacity of the secretory cells, extract from *Cucumaria japonica* increase the stability of the adrenal cortex to the action of extreme factors.

Keywords: stress, *cucumaria japonica*, adrenal gland

Стресс является ярко выраженной адаптивной реакцией, но в то же время может быть причиной невротических, сердечно-сосудистых, эндокринных, иммунных и других заболеваний. Общеизвестно значение гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, отвечающей за поддержания гомеостаза в различных условиях внешней среды. Ключевую роль в процессе адаптации выполняют надпочечники, поэтому их морфофункциональное состояние напрямую влияет на успешное формирование адаптивных механизмов [3, 7]. Интерес к изменениям надпочечных желез при холодном стрессе объясняется чрезвычайным многообразием их функций и значимостью в регуляции углеводного, жирового и белкового обменов [1, 6].

Предупреждение или ограничение последствий стресса является важной задачей медицины, что расширяет задачи ученых в поисках средств, повышающих устойчивость организма в экстремальных условиях. На базе ТИПРО-Центра г. Владивосто-

ка создана биологически активная добавка «Тингол-2» (ТУ 9265-165-00472012-00, ТИ 36-150-2000) – спиртовой экстракт из кукумарии японской (ЭКЯ), содержащий три-терпеновые гликозиды не менее 550 мкг/см³ (патент РФ № 22110377). Тритерпеновые гликозиды голотурий проявляют широкий спектр биологической активности [2].

Целью исследования явилось изучение гистофункционального состояния надпочечников у стрессированных животных после многократного введения ЭКЯ.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 70 белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, содержащихся в виварии при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище, в осенне-зимний период. Подопытные животные были разделены на 7 групп: 1 – интактные; 2 – интактные + острый стресс (контроль); 3 – экспериментальные животные, получавшие ЭКЯ в виде одной ежедневной добавки к основному корму в количестве 0,03 мл на 1 кг веса тела + острый стресс; 4 – интактные + стресс 5 дней (контроль); 5 – экспериментальные животные, полу-

чавшие ЭКЯ + стресс 5 дней; 6 – интактные + стресс 12 дней (контроль); 7 – экспериментальные животные, получавшие ЭКЯ + стресс 12 дней. Эксперименты выполнены согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977). Холодовой стресс моделировали опусканием животных в холодную воду при температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение часа однократно или многократно (до 12 дней по 1 разу в день) [1].

В настоящей работе исследовали эффект ЭКЯ на стадии тревоги (однократное пребывание в воде), стадии резистентности (5 дней стресс – воздействия) и стадии истощения (10 дней стресс – воздействия). После легкого эфирного наркоза крыс декапитировали с одномоментным забором крови для определения уровня кортизола в сыворотке крови. Для приготовления гистологических препаратов использовали левый надпочечник. Его извлекали тотчас после забоя, фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы из средних слоев железы толщиной 7 мк окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления содержания нейтральных жиров получали срезы надпочечников на микротом-криостате МК-25 и окрашивали их суданом-3. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости меньше 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Общеизвестна огромная роль гормонов коры надпочечников в становлении и сохранении гомеостаза, а также их значение для адаптации организма при изменении состояния его внутренней и внешней среды. Кортизол является основным представителем глюкокортикоидов и нарушение обмена кортизола оказывает глубокое влияние на приспособленность организма [4]. У стрессированных животных 2-й группы острое стрессовое воздействие вызывало значительную активацию функции надпочечников, а именно, подъем уровня кортизола ($85,7 \pm 4,10 \text{ nmol/l}$, $p < 0,05$) в два раза по сравнению с интактными животными ($45 \pm 1,83 \text{ nmol/l}$). При остром холодном воздействии наблюдали выраженную делипоидизацию коркового вещества. Вся сетчатая

зона, нижняя и средняя треть пучковой зоны были лишены липидов, местами делипоидизация распространялась вплоть до наружных отделов пучковой зоны.

Известно, что увеличение размеров ядер в гормонпродуцирующих клетках свидетельствует об их повышенной секреторной активности. Кариометрические исследования показали значительное увеличение объема ядер клеток в пучковой зоне (ПЗ) коры надпочечника. Объем ядер достоверно выше, чем у интактных животных на 9,2%. Увеличение объема ядер клеток при незначительном увеличении объема цитоплазмы привело к приросту ядерно-цитоплазматического соотношения на 8,2%. Увеличение размеров клеток привело к небольшому расширению коркового вещества за счет расширения пучковой зоны (таблица). В клубочковой и сетчатой зонах при остром холодном воздействии выраженных изменений в объемах ядер и цитоплазмы не наблюдали, что согласуется с мнением многих авторов.

Получение животными 3-й группы ЭКЯ ограничивало стрессовую реакцию в стадии тревоги, что проявилось менее выраженной гипертрофией клеток, а именно, достоверно меньшим увеличением объема ядер в клетках пучковой зоны (см. таблицу). У животных, получавших ЭКЯ, в надпочечниках не наблюдали тяжелых морфологических и, как следствие, функциональных нарушений. Последнее подтверждает уровень кортизола в крови стрессированных животных, который составил $67,15 \pm 3,32 \text{ nmol/l}$, $p < 0,05$. Этот показатель в два раза снижен по сравнению с контрольными животными 2-й группы, не получавшими пищевых добавок. 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.

Влияние холодного стресса на морфометрические параметры коры надпочечников крыс и их коррекция ЭКЯ

| Группы животных | Ширина клубочковой зоны, мкм | Ширина пучковой зоны, мкм | Объем ядер клеток ПЗ, мкм ² | Объем цитоплазмы клеток ПЗ, мкм ² |
|-----------------|------------------------------|---------------------------|--|--|
| 1 группа | $78,5 \pm 5,02$ | $434,2 \pm 8,34$ | $31,3 \pm 0,99$ | $165,8 \pm 5,87$ |
| 2 группа | $77,3 \pm 6,23$ | $445,0 \pm 15,82$ | $34,2 \pm 0,14^*$ | $175,4 \pm 12,48$ |
| 3 группа | $76,2 \pm 5,81$ | $454,3 \pm 12,59$ | $31,0 \pm 0,16^{**}$ | $180,3 \pm 6,42$ |
| 4 группа | $73,8 \pm 5,71$ | $523,1 \pm 11,23^*$ | $38,9 \pm 0,89^*$ | $198,4 \pm 6,71^*$ |
| 5 группа | $78,4 \pm 6,83$ | $456,7 \pm 10,79^{**}$ | $33,1 \pm 0,63^{**}$ | $190,5 \pm 4,31$ |
| 6 группа | $60,2 \pm 4,95^*$ | $439,6 \pm 10,5$ | $33,5 \pm 0,2$ | $171,8 \pm 5,07$ |
| 7 группа | $89,2 \pm 1,02^{**}$ | $540,5 \pm 14,69^{**}$ | $36,1 \pm 0,16^{**}$ | $218,8 \pm 6,89^{**}$ |

Примечание:

* – значения достоверны по сравнению с интактными животными при $p < 0,05$;

** – значения достоверны по сравнению с животными контрольных групп при $p < 0,05$.

Воздействие холодого фактора в течение пяти дней привело к достоверному увеличению абсолютной и относительной массы надпочечников у крыс 4-й группы. Относительная масса надпочечников увеличилась на 31,2% при отсутствии в приросте массы тела. Цитологические исследования показали, что многократное воздействие холодого фактора вызывало увеличение объема ядер клеток клубочковой зоны на 11,3% и незначительное увеличение объема цитоплазмы при отсутствии в приросте ядерно-цитоплазматических соотношений. Площадь секреторных клеток пучковой зоны статистически достоверно увеличилась. Объем цитоплазмы клеток увеличился на 19,6%. Наряду с гипертрофией секреторных клеток наблюдали увеличение размеров ядер на 24,2% (см. таблицу).

На пятые сутки достоверно увеличился объем ядер клеток сетчатой зоны на 13,2%, а объем цитоплазмы имел небольшой прирост, что вызвало увеличение ядерно-цитоплазматических соотношений на 11,5%. Ширина коркового вещества на пятые сутки эксперимента увеличилась на 12,5%, за счет расширения пучковой зоны на 20,4% (см. таблицу). В пучковой зоне в результате отечных явлений и резкого расширения кровеносных капилляров выявлялась дисконфлексация рядов клеток, стертость межзональных границы.

Коррекция стресса данной пищевой добавкой существенно ослабляла выраженность патоморфологических изменений в надпочечниках. Цитологические измерения адренортикоцитов показали, что гипертрофия клеток коркового вещества стрессированных животных, принимавших ЭКЯ, нарастала постепенно. В пучковой зоне коркового вещества наблюдали умеренную гипертрофию клеток, которая проявлялась достоверно меньшим увеличением объемов ядер и цитоплазмы, чем у стрессированных животных, не получавших ЭКЯ. У экспериментальных животных 5-й группы гипертрофия ядер в клетках пучковой зоны к пятым суткам эксперимента составила 8,1%, цитоплазмы – 11,3%, что привело к незначительному расширению пучковой зоны, ширина которой была достоверно меньше, чем в стресс-контроле на 12,7% (см. таблицу).

По данным гистологического изучения срезов надпочечников, отсутствовали признаки разволокнения соединительнотканной капсулы. В пучковой зоне клетки были сложены в трабекулы линейной формы и направлены к мозговому слою. На 5 сутки отмечали выраженное накопление липидов в верхней и средней трети пучковой зоны

и в отличие от стресс-контрольных животных, у которых только в нижней трети пучковой зоны и в сетчатой зоне появились крупные липидные капли.

Многократные стрессовые воздействия холодого фактора на протяжении 12 суток на животных 6-й группы привели к уменьшению ширины коркового вещества по сравнению с предыдущим экспериментом и приблизились к ширине коркового вещества интактных животных, что по времени соответствовало снижению веса гипертрофированных надпочечников. Ширина пучковой зоны не имела достоверных отличий от ширины этой зоны у интактных животных. Ширина клубочковой зоны достоверно ниже, чем у животных 1-й группы (см. таблицу).

Цитологические исследования показали, что к 12 суткам эксперимента гипертрофия клеток ослабевала и объем ядер и цитоплазмы клеток в клубочковой зоне надпочечника существенно не отличался от показателей интактной группы. Исследование клеток пучковой зоны также выявило тенденцию к уменьшению объема цитоплазмы и объема ядер адренортикоцитов (см. таблицу). Гормональными критериями фазы «максимального напряжения», что предшествует стадии истощения, на 12 сутки можно считать трехкратное повышение уровня кортизола у крыс в стресс-контроле ($92,5 \pm 2,76$ nmol/l), что согласуется с данными литературы.

Гистологическая картина надпочечников крыс, подвергнутых хроническому холодому стрессу, существенно отличалась от группы сравнения. В большинстве случаев соединительнотканная капсула была резко истончена, имелись признаки отека и разволокнения. Зональная структурная организация была нарушена. Нарушалась столбчатость расположения клеток в пучковой зоне (рис. 1). Часть ядер кортикоцитов имели неправильную «лопастную» форму, что является морфологическим свидетельством крайнего функционального напряжения клеток [6]. Наблюдали гиперхромия ядер и кариопикноз в клетках пучковой зоны, а также определяли безъядерные участки вследствие очагового некроза. К 12 суткам наблюдали полное отсутствие липидных капель в клубочковой и сетчатой зонах и только в средней трети пучковой зоны определялись клетки с мелкокапельной и пылевидной концентрацией жировых включений, что, по мнению ряда авторов, свидетельствует об угнетении функциональной активности надпочечников [3, 6]. Анализируя полученные данные, можно предположить, что к 12 суткам экс-

перимента у стресс-контрольных животных 6-й группы появились начальные признаки перехода стадии резистентности к ста-

дии истощения. К этому времени в группе стресс-контроля гибель животных составила 31,2%.



Рис. 1. Кора надпочечника на 12 сутки холодового воздействия у крыс стресс-контрольной группы (6 группа) Окр. г.-э., ув. $\times 100$

Получение животными 7-й группы биологической добавки, содержащей тритерпеновые гликозиды, оказывало заметное положительное действие на кору надпочечников. В клубочковой зоне объемы ядер и цитоплазмы имели достоверные отличия по сравнению со стресс-контролем. Размеры клубочковой зоны коры преобладали над размерами этой зоны у крыс, не получавших ЭКЯ. Сохранялась гипертрофия клеток в пучковой зоне за счет сохранения гипертрофии ядер и цитоплазмы (см. таблицу). Пучковая зона оставалась умеренно гипертрофированной по сравнению с интактными животными и достоверно отличалась от стресс-контроля на 22,9%. Постепенное нарастание гипертрофии клеток на протяжении всего эксперимента, сохранение умеренной гипертрофии к 12 суткам опыта, статистически значимые отличия от стресс-контроля, свидетельствовали о сохранении функциональных резервов в секреторных клетках. У экспериментальных животных уровень кортизола более стабилен и достоверно ниже по сравнению со стресс-

контролем ($68,0 \pm 1,50$ nmol/l). Гибель экспериментальных животных к окончанию эксперимента составила 8%, что значительно меньше, чем в контроле. Получение крысами биологически активной добавки уменьшало выраженность морфологических изменений коры надпочечников. Граница между клубочковой и пучковой зонами сохранилась почти на всем протяжении (рис. 2). Адренокортикоциты пучковой зоны не претерпевали выраженных изменений и были сложены в трабекулы линейной формы. Явления умеренной липидной насыщенности коры свидетельствовали о сохранении функций этой зоны. К 12 суткам уровень кортизола у самцов 6-й группы составил $92,5 \pm 2,50$ nmol/l, тогда как у экспериментальных животных 7-й группы – $77,0 \pm 4,0$ nmol/l, $p < 0,05$. На основании полученных данных можно сказать, что к 12 суткам холодового воздействия у стресс-экспериментальных животных отмечали постепенное нарастание гипертрофии надпочечников, отсутствие потерь в весе тела, что и привело к формированию более выраженной стадии резистентности.

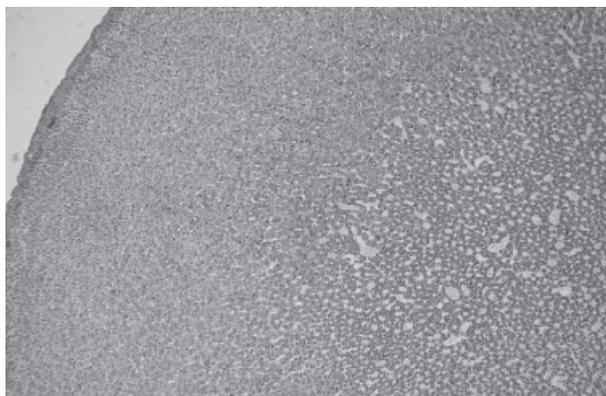


Рис. 2. Кора надпочечника на 12 сутки холодового воздействия у экспериментальных крыс (7 группа) Окр. г.-э., ув. $\times 100$

Заключение

Гипертрофия надпочечников, осуществляемая за счет усиления кровенаполнения и увеличения паренхиматозной массы коркового вещества, занимает центральное место в изменениях, происходящих при хроническом стрессе на структурном уровне [5, 6]. Введение биологически активной добавки, содержащей тритерпеновые гликозиды, оказывало положительное влияние на течение стресс-реакции в коре надпочечников, не вызывало выраженных структурных изменений в коре, стабилизировало секреторную активность глюкокортикоид-продуцирующих клеток, а также способствовало сохранению умеренной липидной насыщенности.

Таким образом, сохраняя резервные возможности секреторных клеток, экстракт из кукумарии японской повышает устойчивость коры надпочечника к действию экстремальных факторов и оказывает адаптивный эффект.

Список литературы

1. Авакян А.Р., Лазарев А.И., Прокопенко Л.Г. Иммуномодулирующее действие лизоцима при остром холодовом воздействии // Антибиотики и химиотерапия. – 2002. Т. 47, №2. – С. 3–7.
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 И.К., Лоншакова К.С., Шантанова Л.Н. Влияние иммобилизационного стресса на гистологическую структуру надпочечников белых крыс // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – №2. – С. 258–260.
4. 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.
5. Перцов С.С., Коплик Е.В., Калинин Л.С. Сравнительный анализ действия цитокинов на состояние тимуса, надпочечников и селезенки у крыс с разными поведенческими характеристиками // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – №9. – С. 244–247.

6. Степанян Ю.С. Структурные изменения надпочечников при холодовой травме // Проблемы экспертизы в медицине. – 2009. – Т.36, №4. – С. 21–23.

7. Lunga P., Herbert J. 17 β -Qestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptation to repeated restraint stress in semale rats // J. Neuroendocrinol. – 2004. – Vol.16, №9. – P. 776–785.

References

1. Avakjan A.R., Lazarev A.I., Prokopenko L.G. Immunomodulirujuwee dejstvie lizocima pri ostrom holodovom vozdejstvii // Antibiotiki i himioterapija. 2002. T.47, no. 2. pp. 3–7.
2. Zenkina V.G., Karedina V.S., Solodkova O.A. Morfologija jaichnikov androgenizirovannyh kryс na fone priema ekstrakta iz kukumarii // Tihookeanskij medicinskij zhurnal. 2007. no. 4. pp. 70–72.
3. Ivanova I.K., Lonshakova K.S., Shantanova L.N. Vlijanie immobilizacionnogo stressa na gistologicheskiju strukturu nadpochechnikov belyh kryс // Bjulleten' VSNЦ SO RAMN. 2009. no. 2. pp. 258–260.
4. Polina Ju.V., Rodzaevskaja E.B., Naumova L.I. Uroven' kortizola i morfologija nadpochechnikov pod vozdejstviem nizkointensivnogo jelektromagnitnogo izlucheniya i pri stressе // Saratovskij nauchno-medicinskij Zhurnal. 2008. no. 1. pp. 127–130.
5. Percov S.S., Koplik E.V., Kalinichenko L.S. Sravnitel'nyj analiz dejstvija citokinov na sostojanie timusa, nadpochechnikov i selezenki u kryс s raznymi povedencheskimi harakteristikami // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2010. no. 9. pp. 244–247.
6. Stepanjan Ju.S. Strukturnye izmeneniya nadpochechnikov pri holodovoj travme // Problemy jekspertizy v medicine. 2009. T.36, no. 4. pp. 21–23.
7. Lunga P., Herbert J. 17 β -Qestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptation to repeated restraint stress in semale rats // J. Neuroendocrinol. 2004. Vol.16, no. 9. pp. 776–785.

Рецензенты:

Матвеева Н.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО ВГМУ, г. Владивосток;

Хасина М.А., д.м.н., профессор кафедры биологической химии, клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ГБОУ ВПО ВГМУ, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 09.08.2012.