

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ПАНТОЛЕНА НА КРОВЬ
КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

биологического факультета

Фроловой Марии Александровны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

_____ Е.С. Тучина
дата, подпись

Зав. кафедрой

профессор, д-р биол. наук,

профессор кафедры биохимии и биофизики

_____ С.А. Коннова
дата, подпись

Саратов 2020

Актуальность работы. Существование человека в условиях современной техносферы, нарушение веками складывавшихся между людьми и природой взаимоотношений приводят к возникновению стрессов различной природы, их накоплению и развитию патологических изменений в тканях, органах и системах. Также в последние десятилетия в мире формируется очень сложная экологическая ситуация. Загрязнение окружающей среды провоцирует развитие различных заболеваний. Негативное влияние оказывают и продукты питания, в которых содержится большое количество консервантов и других всевозможных химических веществ.

Эмоциональные перегрузки, напряженный ритм жизни, несбалансированное питание привели к резкому повышению роста числа многих заболеваний. Многочисленные стрессы и гиподинамия, вызвали интерес ученых к адаптогенам – препаратам, повышающим стресс-резистентность организма, его адаптивные возможности.

В настоящее время возникла необходимость создания новых форм оздоровления, повышения стресс-резистентности. На первый план выходят биологически активные добавки, и большой интерес в связи с широким спектром действия вызывают препараты, получаемые при переработке продуктов пантового оленеводства. В пантах содержатся аминокислоты, витамины, органические соединения, минеральные соли, ферменты и другие компоненты. А также биологически активные вещества, необходимые для построения различных клеток и тканей, получения энергии, обеспечивающей протекание всех биологических процессов организма.

Пантовые препараты используют в качестве стимуляторов умственной и физической работоспособности. Препараты на основе продуктов пантового оленеводства являются наиболее эффективными и безопасными для профилактики и многих заболеваний. При их применении происходит полная или частичная компенсация возникшего в организме нарушения. Однако механизмы действия данных препаратов известны

недостаточно. Изучение механизмов действия различных биологически активных добавок, в том числе пантовых, является очень актуальным, так как в настоящее время они выпускаются в больших масштабах.

На кафедре физиологии человека и животных, а также биохимии и биофизики СГУ несколько лет ведётся совместная работа по изучению адаптогенных свойств пантовых препаратов на различные органы и ткани организма.

В связи с выше изложенным данная работа имеет практическую значимость и очень актуальна.

Целью работы явилось изучение некоторых аспектов действия препарата «Пантолен» на показатели крови крыс при иммобилизационном стрессе.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние препарата «Пантолен» на показатели крови (число эритроцитов, содержание гемоглобина, каталазную активность, процессы перекисного окисления липидов) самцов белых крыс.
2. Оценить влияние иммобилизационного стресса на исследуемые показатели крови самцов белых крыс.
3. Проанализировать изменения в показателях крови самцов белых крыс при введении препарата «Пантолен» на фоне иммобилизационного стресса.
4. Выявить изменения электрических показателей крови самцов белых крыс введении препарата «Пантолен» на фоне иммобилизационного стресса методом импедансометрии.

Структура магистерской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: сокращения, введения, основной части, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материал и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из восьми подразделов: История использование пантов, характеристика химического состава пантов

марала, влияние пантовых препаратов на белковый и углеводный обмены, применение пантовых препаратов, стресс и его влияние на организм, изменения в составе крови при стрессе, ПОЛ как первичный медиатор стресса, электропроводные свойства крови крыс при иммобилизационном стрессе. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает в себя: показатели красной крови самцов белых крыс при введении «Пантолен» в покое и при иммобилизационном стрессе, цветовой показатель у самцов белых крыс, сравнение уровня МДА в эритроцитах контрольных и опытных групп животных, динамика изменения активности каталазы в плазме крыс контрольной и опытных групп, дисперсия величины импеданса ($\lg Z$, кОм) эритроцитов самцов белых крыс, дисперсия величины импеданса ($\lg Z$, кОм) эритроцитов самцов белых крыс при стрессе.

Объектом исследования служили здоровые белые беспородные крысы: 40 самцов.

Основное содержание работы. Исследование проводили на кафедре биофизики и биохимии Саратовского государственного научно-исследовательского университета имени Н.Г.Чернышевского. Эксперимент был выполнен на здоровых белых беспородных крысах со средней массой тела 200 г. Всех животных содержали в виварии кафедры физиологии человека и животных в стандартных контролируемых условиях: 12-часовой период освещения, температура воздуха плюс $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, влажность 50-70%, корм и вода ad libitum.

Постановка эксперимента. По характеру воздействия животные были разделены на 4 группы по 10 в каждой:

- 1 группа – контрольная группа, животные не подвергались воздействию;
- 2 группа – животные получали 4 мг «Пантолен» на протяжении 10 дней;
- 3 группа – животные подвергались иммобилизационному стрессу в течении 10 мин;

4 группа – животные получали 4мг «Пантолен» на протяжении 10 дней и подвергались иммобилизационному стрессу в течении 10 мин

«Пантолен» животные получали с кормом в дозе 4мг. на крысу один раз в сутки на протяжении 10 дней.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации. В собранной при декапитации животных крови подсчитывали число эритроцитов и определяли содержание гемоглобина, определяли малоновый диальдегид, активность каталазы и изменение величины импеданса в эритроцитах.

Для установления достоверности различий вариационных рядов определяли показатель достоверности различий и по таблице Стьюдента находили величину отклонения (P). Различия считали достоверными при вероятности различий, превышающей 95 %.

Обсуждение результатов исследования.

Анализ изменений показателей крови под действием препарата «Пантолен»

У самцов белых крыс контрольной группы число эритроцитов в крови составило $(6,31 \pm 0,44) \times 10^{12}$ /л, а содержание гемоглобина было равно $(126,21 \pm 9,34)$ г/л. Содержание гемоглобина в одном эритроците было равно $(20,0 \pm 1,5)$ пг.

Введение крысам БАД «Пантолен» не вызвало существенных изменений изученных показателей красной крови, они остались в пределах контрольных значений. Так, содержание эритроцитов в крови самцов было $(6,42 \pm 0,48) \times 10^{12}$ клеток/л, а содержание гемоглобина составило $(126,21 \pm 9,34)$ г/л.

Отсутствие сдвигов изучаемых показателей можно рассматривать как положительный факт. Значительное увеличение числа эритроцитов могло бы привести к повышению вязкости крови. Это, в свою очередь, затруднило бы циркуляцию крови, что неблагоприятно для людей с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Стресс привел к статистически значимым изменениям изучаемых

показателей. При иммобилизации в крови самцов крыс обнаружили увеличение числа эритроцитов на 71%. Содержание гемоглобина относительно контроля возросло на 67%. Можно предположить, что описанные изменения явились результатом перераспределительного эритроцитоза – экстренные состояния приводят к резкому выбросу в кровяное русло эритроцитов из органов-депо.

Депо крови – органы-резервуары, в которых у высших животных и человека может храниться изолированно от общего кровотока около 50% всей крови. Основные депо крови – селезёнка, печень и кожа. Возможность функционирования этих органов в качестве депо крови обусловлена своеобразным строением их сосудистой системы. В селезёнке часть крови проникает в межклеточные пространства и оказывается исключённой из общей циркуляции; обратное поступление крови в общий кровоток осуществляется при сокращении гладкой мускулатуры селезёнки. В печени задержка крови может быть обусловлена превышением притока крови над её оттоком; освобождение печени от избытка крови происходит вследствие резкого сужения сосудов, приносящих к ней кровь. В коже кровь резервируется в подсосочковых сплетениях капилляров (параллельных ответвлениях от основного кровяного русла кожи), где кровь течёт непрерывно.

В условиях иммобилизации, как и при иных стрессах, существенно увеличивается потребление кислорода тканями, и важнейшим механизмом экстренного повышения кислородной ёмкости крови является выведение в системный кровоток запасов депонированной крови. Происходит это благодаря тому, что в норме при стрессе активируется симпатический отдел вегетативной нервной системы, усиливается секреция катехоламинов из мозгового слоя надпочечников, и в организме происходят определённые изменения. Например, возбуждение α -адренорецепторов вызывает сокращение капсулы селезёнки и выход крови из депо в системный кровоток, что приводит к развитию относительного эритроцитоза.

Наблюдавшееся увеличение показателей красной крови при иммобилизации белых крыс может быть связано также с активизацией коры надпочечников как важнейшей структуры, участвующей в реализации стрессовых реакций, и усилением секреции кортикостерона.

При стрессе на фоне предварительного введения «Пантолен» содержание эритроцитов и гемоглобина у самцов крыс было также выше, чем у интактных животных. Количество эритроцитов у самцов увеличилось на 24%, а содержание гемоглобина – на 34% по сравнению с контрольными животными. Однако оба показателя были существенно меньше, чем при иммобилизации животных, не получавших «Пантолен».

Таким образом, у самцов введение препарата «Пантолен» снижает стрессорную реакцию на иммобилизацию по показателям красной крови. Уменьшение числа эритроцитов и количества гемоглобина в крови белых крыс при иммобилизации в данном случае нельзя рассматривать как неблагоприятное изменение. Вероятно, этого количества красных кровяных клеток и гемоглобина при иммобилизации было достаточно для того, чтобы полностью обеспечить работающие мышцы кислородом, не увеличивая при этом вязкость крови. В литературе имеются сведения о том, что «Пантолен» сдерживает стрессорное увеличение числа эритроцитов и количества гемоглобина, однако физическая выносливость животных при этом повышается – время плавания крыс с отягощением, получавших «Пантолен», увеличилось на 49% по сравнению с интактными особями.

Исследование состава пантовых препаратов свидетельствует о том, что содержащиеся в них биологически активные вещества усиливают метаболические процессы, в том числе за счет активации обмена кислорода.

Важно отметить, что количество гемоглобина, содержащееся в одном эритроците у самцов, существенно не изменялось ни при введении «Пантолен», ни при иммобилизации, ни при их сочетанном действии. Соответственно, и цветной показатель оставался в пределах нормы. Эритроциты самцов крыс были нормохромными, о чем свидетельствовал

цветовой показатель.

Данный показатель несет информацию о степени насыщения красных кровяных телец (эритроцитов) пигментом, содержащим железо и переносящим кислород – гемоглобином. Это связано с тем, что в циркулирующую кровь при стрессе поступают именно депонированные эритроциты, а не образовавшиеся вновь в процессе гемопоэза.

Имеются литературные данные о том, что пантовые препараты способствуют оптимизации потребления кислорода клетками и тканями. Можно предположить, что «Пантолен» способствует устойчивости организма к стрессу, поддерживая энергетический обмен в клетках на должном уровне, предупреждает возникновение чрезмерного эритроцитоза у крыс. Следовательно, «Пантолен» предотвращает и отрицательные последствия сгущения крови, облегчает сердечно-сосудистую деятельность при стрессе. При этом в покое, как было отмечено ранее, в использованной дозе на показатели красной крови самцов и самок белых крыс «Пантолен» не влияет.

Таким образом, введение «Пантолен» белым крысам на протяжении 10 дней в дозе 4 мг на особь один раз в сутки не влияет на содержание эритроцитов и гемоглобина в крови животных в покое, но сдерживает стрессорное увеличение данных показателей.

Изучение процесса перекисного окисления липидов в клетках крови под действием препарата «Пантолен»

Перекисное окисление липидов является нормальным процессом метаболизма, который играет роль необходимого звена в жизнедеятельности организма и его адаптационных реакциях. Однако в условиях стресса процессы перекисного окисления становятся цепными, образовавшиеся свободные радикалы в этих реакциях затрагивают структуру и функции клеточных мембран, что приводит к развитию различных патологических изменений.

Естественной моделью для выявления структурно-функциональных изменений мембран клеток служат эритроциты крови. Особый интерес представляет изучение изменения малонового диальдегида как основного показателя интенсивности процессов ПОЛ и как маркера степени эндогенной интоксикации. Повышение его величины является методом раннего выявления метаболических нарушений в организме.

На первом этапе исследования проводилось сравнение уровня МДА в эритроцитах крови контрольной, стрессированной и группы животных получавшей «Пантолен».

Анализ экспериментального материала позволяет сделать заключение о том, что при стрессе исходный уровень МДА достоверно увеличен в сравнении с контролем. Десятидневное введение животным «Пантолен» не достоверно повышает физиологический уровень липидной пероксидации. Увеличение содержания МДА в этой группе можно рассматривать как последствия преадаптации.

10-ти дневного введения «Пантолен» животным перед иммобилизационным стрессом, оказывало корригирующее влияние на процессы ПОЛ.

Таким образом, в условиях эксперимента «Пантолен» проявил при предварительном введении крысам достоверные и выраженные антиоксидантные свойства по подавлению стресс-индуцированного накопления в эритроцитах конечных продуктов ПОЛ.

Эффект действия «Пантолен», как природного антиоксиданта подтверждают эксперименты по определению в плазме крыс активности каталазы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизационный стресс снижает активность каталазы (на 558,83 мкат/мл), что подтверждает сдвиг равновесия между антиоксидантной защитой и пероксидацией в сторону увеличения продуктов ПОЛ (концентрация МДА значительно увеличилась).

При введении «Пантолен» активность каталазы увеличилась на 4,6% по сравнению с контролем, что может говорить о замедлении процессов перекисного окисления. Известно, что важнейшим антиоксидантным ферментом плазмы крови является медь содержащий белок церулоплазмин, активность которого может повышаться от ионов меди, которые в большом количестве представлены в «Пантолен». Кроме того, содержащийся в «Пантолен» витамин Е(токоферол) обладает исключительно высокой антирадикальной активностью и стабилизацией липидного бислоя мембран.

Таким образом, суммируя все изложенное с большой точностью можно заметить, что 10-дневный прием «Пантолен» снижает концентрацию МДА и повышает активность каталазы в крови крыс т.е. активирует антиоксидантные механизмы и подавляет активность ПОЛ, нормализуя, таким образом,прооксидантно-антиоксидантное равновесие .

Изучение электрических характеристик клеток крови под действием препарата «Пантолен»

При стрессенаибольшая активность перекисного окисления наблюдается вклеточных мембранах, то в зонах мембранных фосфолипидов возникают каналы пассивной проницаемости, через которые свободно проходят ионы и вода, что отражается на электрических характеристиках тканей в целом. Метод, позволяющий зафиксировать подобные явления даже на ранних этапах развития патологии, – импедансометрия, основан на измерении величины электрического сопротивления исследуемой ткани.

Так как ткань наиболее быстро отвечает на патологические процессы, интересно проследить изменение величины импеданса в эритроцитах животных контрольной группы и животных, которые подвергались стрессированию.

В эксперименте определяли частотную зависимость импеданса эритроцитов контрольных животных, с которыми сравнивали такие же показатели у крыс в условиях иммобилизационного стресса и у крыс, получавших «Пантолен» в течение 1 дня.

По результатам, в соответствии с рисунком 3, установлено, что достоверные различия значений импеданса эритроцитарной массы на высоких частотах по сравнению с контрольной группой, вызывает иммобилизационный стресс.

У группы получавших «Пантолен» достоверных различий с контролем не выявлено. Снижение значений импеданса при стрессе, т.е. увеличение электропроводности может свидетельствовать о дестабилизации мембран. Причиной подобного явления служит конечный продукт ПОЛ: малоновый диальдегид, влияющий на проницаемость мембран.

У эритроцитов крови крыс, подвергавшихся иммобилизации, отмечаются низкие показатели, что свидетельствует о более высокой электропроводности и чувствительности к гиперпродукции свободных радикалов.

Изменение электропроводности при стрессовой реакции, происходит с понижением реактивности организма, связанным с активацией процессов ПОЛ на фоне истощения системы глутатиона. При этом характер выраженности изменений являются отражением вовлечения стресс-реализующих систем организма и сопряжены с развитием стресс-реакции, тогда как система глутатиона работает как неспецифическое звено антиоксидантной системы на начальных стадиях адаптационного синдрома, и лишь относительно влияет на величину электропроводности.

Далее в эксперименте исследовали животных, которые получали «Пантолен» в течение 10 дней, а затем подвергались иммобилизационному стрессу. При этом достоверных отличий от контрольных значений выявлено не было.

Препарат «Пантолен» содержит высокоактивные белковые и пептидные регуляторные молекулы (ростовые факторы), витамин С, аминокислоты, нуклеотиды, макро- и микроэлементы, обладающие способностью оптимизировать обмен веществ, повышать образование энергии и содержание белка в клетках.

При исследовании импеданса в клетках эритроцитов было выявлено, что под действием стресса происходит активация процессов перекисного окисления приводящих к образованию мембранных «протечек», набуханию клеток, изменение объема и как следствие падению величины импеданса.

Это может свидетельствовать о том, что «Пантолен» хорошо усваивается в организме, его компоненты (витамины, фосфолипиды и белки) стабилизируют клеточные мембраны эритроцитов, приближая значения к контрольным показателям, и повышают резистентность к стрессу

Заключение. По результатам проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. Определено, что исследуемые показатели в крови самцов крыс контрольной группы соответствовали норме (эритроциты $5,5-11,0 \times 10^{12}$ клеток/л, гемоглобин от 128 до 192 г/л).

2. Обнаружено, что иммобилизационный стресс сопровождается увеличением количества эритроцитов и гемоглобина в крови самцов крыс по сравнению с животными контрольной группы в 1,5 раза, усиливает процессы ПОЛ в 5 раз, о чем свидетельствует повышение концентрации МДА и снижение активности каталазы.

3. Установлено, что пролонгированный прием животными БАДа «Пантолен» перед стрессом нормализует количество эритроцитов до значения $7,83 \times 10^{12}$ клеток/л, гемоглобина до значения 169,63 г/л, снижает количество маркеров ПОЛ (МДА до 19,92 мкмоль/л, каталазы до $1049,51 \times 10^{12}$ мкат/мл).

4. Показано, что под влиянием стресса увеличение электрических показателей (импеданса и электропроводности) происходит в 1,5 раза, что может свидетельствовать о нарушении проницаемости мембран эритроцитов крови; протективные свойства препарата «Пантолен» обуславливают возвращение значений импеданса к контрольным цифрам ($\lg Z = 0,71$ кОм) после 10-ти дней приема данного препарата перед экспериментом.