

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. В. В. Трохимчуком

УДК 615.214:616.45-001.1/.3

ВПЛИВ ФІТОАДАПТОГЕНІВ НА ПРОТИВІРУСНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТВАРИН В УМОВАХ СТРЕСУ РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ ТА ІНТЕНСИВНОСТІ

© І. В. Ковальчук, Я. В. Рожковський

Одеський державний медичний університет

Резюме: в досліджах на мишах лінії СВА встановлено, що відвари підземної частини рослин-адаптогенів (аралія маньчжурська, елеутерокок колючий, левзея сафлоровидна, женьшень, родіола рожева), які вводили перорально протягом 10 діб в дозі 0,5 г/кг, посилюють природну активацію механізмів адаптації при ротаційному стресі та зменшують негативний вплив комбінованого стресу на клітинні і гуморальні фактори противірусної резистентності, підсилюючи інтерфероноутворення і реакцію К-клітин крові у відповідь на інфікування вірусом грипу А у післястресовому періоді та суттєво зменшуючи летальність тварин від вірусної інфекції.

Ключові слова: фітоадаптогени, противірусна резистентність, ротаційний стрес, комбінований стрес.

Вступ. Відомим є факт, що рослини-адаптогени (женьшень, елеутерокок, китайський лимонник, родіола рожева, аралія маньчжурська та інші) підвищують резистентність організму до дії екстремальних факторів передусім шляхом активації природних неспецифічних механізмів захисту, тобто мають стрес-протекторну активність [1, 2, 8, 10]. Проте призначення і можливості впливу адаптогенів на організм виходять за межі виключно стрес-протекції. Їм притаманний стимулювальний і тонізуючий ефекти, здатність підвищувати розумову і фізичну працездатність, гістопротекторна, гормонорегулююча, репаративна, антиоксидантна, імунотропна, протипухлинна та інші види активності [1, 2, 7, 10]. При цьому відомо, що виразність захисного впливу фітоадаптогенів при екстремальних навантаженнях значною мірою залежать від характеру і тривалості дії стресових факторів. Як відомо, нетривалі і помірковані за силою стресові чинники можуть стимулювати резистентність організму, тоді як хронічний стрес, особливо під час стадії виснаження, однозначно викликає імуносупресію [2, 3, 9]. Разом з тим, незважаючи на досліджену стрес- та імунопротекторну активність фітоадаптогенів, деякі особливості їхньої імунотропної дії, зокрема вплив на фактори противірусного захисту в умовах стресових навантажень різної тривалості та інтенсивності, залишається малодослідженим, що обмежує їхнє застосування і в умовах супутнього вірусного інфікування. Метою дослідження було вивчення впливу окремих фітоадаптогенів на інтегральні показники противірусної резистентності в умовах вірусного інфікування організму, яке здійснювалось після перенесеного стресу різної тривалості та інтенсивності.

Методи дослідження. Дослідження проводили на 336 мишах лінії СВА масою 18-20 г. У роботі використано 2 моделі експериментального стресу: ротаційний стрес – обертання тварин зі швидкістю 78 об./хв протягом 1 години, 10 хвилин обертів чергуються з 5 хв перерви [3] та комбінований стрес – охолодження тварин при 50 °С протягом 2 годин в металічних контейнерах з наступною їх іммобілізацією протягом 18 годин [2]. У роботі досліджувались імунопрофілактичні ефекти відварів, виготовлених з підземної частини аралії маньчжурської (*Aralia mandshurica*), елеутерококу колючого (*Eleutorococcus senticosus*), женьшеня (*Panax Ginseng L.*) родини Аралієвих (*Araliaceae*); родіоли рожевої (*Rhodiola rosea L.*) родини Товстянкових (*Crassulaceae*); та левзеї сафлоровидної (*Rhaponticum carthamoides*) родини Айстрових (*Asteraceae*). Сировина культивована і заготовлена на території України. Приготування відварів регламентовано Державною фармакопеею України [5]. У попередній серії експериментів була встановлена мінімальна доза фітопрепаратів – 0,5 г/кг (0,2 мл відвару на 1 тварину), пероральне уведення якої протягом 10 діб не змінювало морфофункціонального стану стрес-компетентних органів. Протягом 10 діб перед відтворенням стресу та наступних 4 діб експозиції стресу фітопрепарати у зазначеній дозі вводили у шлунок тваринам через зонд о 10 годині ранку. Контрольні тварини отримували аналогічний об'єм дистильованої води. Мишей умертвляли шляхом дислокації шийних хребців після попереднього ефірного наркозу. Стан клітинної ланки противірусної резистентності організму оцінювали за функціональною активністю кілерних клітин крові (К-клітини) [4]. Оскільки цитотоксична фун-

кція К-клітин є антитілозалежною, для її оцінки як клітин і мішені використовували еритроцити барана, оброблені антисироваткою різного розведення. Завись мононуклеарних клітин, виділених з периферійної крові, змішували в розчині Хенкса з клітинами-мішенями у співвідношенні 5 : 1, інкубували протягом 3,5 годин при температурі 37 °С, центрифугували при 400 g протягом 15 хвилин і в надосадовій рідині спектрофотометричним методом при $\lambda = 414$ нм вивчали оптичну густину отриманих супернатантів. Процент гемолізу вираховували за формулою $(E_e - E_k) / E_{max} \cdot 100\%$, де E_e – оптична густина експерименту; E_k – оптична густина контролю (суміш ефекторних клітин з еритроцитами барана, не оброблених антисироваткою); E_{max} – оптична густина за умов максимального гемолізу відповідної кількості еритроцитів.

Стан гуморальної ланки противірусного імунітету оцінювали за інтенсивністю вірусіндукованого інтерферонуутворення, яке моделювали шляхом інтраназального зараження тварин сублетальною дозою патогенного штаму вірусу грипу А 3,5 Іg ЕІД50 (0,2 мл). Відповідна доза вірусу грипу А була визначена серією попередніх дослідів із зараженням тварин різними дозами

збудника інфекції з наступною реєстрацією загибелі інфікованих мишей протягом 14 діб. Зараження кожної групи тварин здійснювали після припинення експозиції стресу. Рівень α -інтерферону в сироватці крові визначали через 2, 4 і 7 діб після інфікування шляхом титрування його противірусної активності загальноприйнятим методом [6]. Летальність оцінювали за процентом загиблих тварин протягом 14 діб після їх зараження. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою критерію Стьюдента.

Результати й обговорення. Проведеннями дослідженнями встановлено, що вірусіндуковане інтерферонуутворення як фактор гуморального противірусного захисту максимально активується вже на початкових етапах після зараження інтактних тварин, тоді як патогенетичне значення клітинного фактора резистентності – К-клітин крові зростає поступово. Цитопатогенна активність К-клітин інтактних мишей досягає максимальної активності лише через 4 доби після їх зараження, тоді як активність інтерферонуутворення вже починає знижуватися. Летальність тварин, яку оцінювали через 14 діб після їх зараження, склала 25,0% (табл.1).

Таблиця 1. Вплив фітоадаптогенів на титри α -інтерферону в сироватці крові та рівень летальності мишей лінії СВА (n=10-12), заражених після припинення дії стресу сублетальною дозою вірусу грипу А ($M \pm m$)

Група тварин		Титри α -інтерферону після зараження через			Летальність (%)
		2 доби	4 доби	7 діб	
Інтактні тварини		1:145	1:80	1:45	25,0
Ротаційний стрес	Контроль (H ₂ O)	1:160	1:80	1:40	25,0
	Аралія	1:215	1:180	1:85	0
	Елеутерокок	1:210	1:180	1:100	0
	Левзея	1:200	1:170	1:95	0
	Женьшень	1:240	1:225	1:125	0
	Родіола	1:250	1:230	1:125	0
Комбінований стрес	Контроль (H ₂ O)	1:90	1:40	1:25	83,3
	Аралія	1:165	1:145	1:70	25,0
	Елеутерокок	1:160	1:135	1:85	16,6
	Левзея	1:140	1:125	1:80	33,3
	Женьшень	1:170	1:145	1:75	33,3
	Родіола	1:170	1:150	1:80	8,3

Встановлено, що в умовах м'якого і нетривалого стресового навантаження, якою є модель ротаційного стресу, природні механізми противірусного захисту організму суттєво не змінюються. Ротаційний стрес викликає лише незначне посилення інтерферонуутворення, яке спостерігається через 2 доби після інфікування мишей і підтверджується додатковим зростанням титрів α -інтерферону до 1:160 проти збільшення цьо-

го показника до 1:145 при зараженні інтактної групи. В інші терміни спостережень показники противірусної резистентності тварин, які перед інфікуванням зазнали ротаційного стресу, достовірно не відрізнялись від показників інфікованих тварин, які стресу не зазнавали. Летальність інфікованих після ротаційного стресу тварин, порівняно з зараженими мишами інтактної групи, не змінювалась і залишалась на рівні

25,0%. Тварини, які профілактично протягом 10 діб перед відтворенням ротаційного стресу отримували фітозасоби, відповідали на вірусне інфікування більш посиленим і пролонгованим інтерфероноутворенням та суттєвим збільшенням цитопатогенної активності К-клітин, порівняно з нелікованою групою. Під впливом фітоадаптогенів титри інтерферону та активність кілерних клітин після зараження стресованих мишей в усі періоди спостережень значно перевищували відповідні показники контрольної групи, яка отримувала лише воду. При цьому активація К-клітинної цитотоксичності під впливом фітоадаптогенів відбувалась вже на ранніх етапах після зараження тварин і тривала протягом більшого терміну, ніж у інфікованих тварин контрольної групи. Отже, ротаційний стрес – це м'яка модель стресу, яка не впливає на природні механізми противірусного захисту і не змінює летальності мишей після їх вірусного інфікування, тоді як корекція стресу фітоадаптогенами додатково посилює вірусіндуковану стимуляцію гуморальних і клітинних факторів противірусної резистентності, зменшуючи летальність інфікованих після стресу тварин від 25,0 до 0%.

В умовах більш жорсткої і пролонгованої моделі комбінованого стресу характер вірусіндукованого інтерфероноутворення був дещо іншим. Через 2 доби після зараження мишей, які зазнали впливу комбінованого стресу, титр α -інтерферону в сироватці їх крові знижувався до 1:90, через 4 доби – до 1:40, і через 7 діб – до 1:25, що відповідно на 37,9, 50,0 і 44,4 % було меншим, аніж в інтактній групі. Летальність зростала до 83,3%. Це вказує на розвиток індукованої стресом депресії відносно показників противірусного імунітету. Як і в умовах попередньої моделі, профілактика фітоадаптогенами комбінованого стресу виявила виразну стимуляцію інтерфероноутворення після зараження тварин в усі терміни спостережень. Зокрема титри інтерферону через 2 доби після зараження мишей в умовах даної моделі стресу при профілактичному застосуванні аралії залишались на рівні 1:165, елеутерококу – на рівні 1:160, левзеї – 1:140, женьшеню – 1:170 і родіоли рожевої – 1:170, тоді як у нелікованих тварин титри інтерферону у цьому терміні спостережень знижувались до показника 1:90. Через 4 доби після зараження, коли інтенсивність вірусіндукованого інтерфероноутворення у тварин контрольної групи знижувалась більш ніж удвічі і становила 1:40, на фоні профілактичного застосування аралії титри інтерферону зберігались на рівні 1:145; елеутерококу – на рівні 1:135; левзеї – 1:125; женьшеню – 1:145 і родіоли рожевої – 1:150. Тобто, в умовах комбінованого стресу фітоадаптогени не

лише запобігали зниженню інтенсивності вірусіндукованого інтерфероноутворення, але й суттєво збільшували його тривалість, що звичайно позитивним чином впливало на показники летальності від вірусної інфекції, які знижувались у різних дослідних групах з 83,3 % до 8,3 – 33,3 %.

Позитивний вплив фітоадаптогенів в умовах даної моделі стресу був виявлений і відносно корекції порушень клітинної ланки противірусної резистентності. Якщо в умовах комбінованого стресу К-клітинна цитотоксичність у незаражених мишей, порівняно з інтактними, знижувалась у 1,4 раза – з (35,1 \pm 3,3) % до (25,1 \pm 3,0) % ($P < 0,05$), то в усіх групах тварин, які профілактично отримували адаптогени, цей показник залишався незмінним. Нами також встановлено, що комбінований стрес усуває характерну компенсаторну активацію К-клітинної цитотоксичності у відповідь на вірусне інфікування, яке максимально проявляється через 4 доби після зараження тварин інтактної групи (табл. 2). Тобто, клітинні фактори противірусної резистентності в умовах комбінованого стресу не відповідали своєю додатковою активацією у відповідь на вірусне інфікування, яке спостерігалось після зараження інтактних тварин. Ймовірно, це є одним з проявів імунодепресивної дії даної моделі стресу. Як наслідок, функціональна активність К-клітин після зараження стресованих тварин в усі терміни спостережень залишалась на рівні, майже удвічі нижчому, ніж у тварин інтактної групи. Профілактичне застосування фітоадаптогенів не лише сприяло збереженню функціональної активності К-клітин, але й відновлювало їх активацію вже на ранніх етапах після інфікування, зберігаючи підвищену активність К-клітин протягом усього експерименту. Найбільш вдала корекція К-клітинної цитотоксичності у інфікованих після стресу тварин спостерігалась на фоні застосування фітозасобу родіоли рожевої, завдяки якому активність К-клітин через 2 доби після вірусного інфікування переважала аналогічний показник нелікованої групи (контроль H_2O) у 2,76 раза, через 4 доби – у 2,61 раза, і через 7 діб – у 2,93 раза ($P < 0,05$) (табл. 2).

Отже, в умовах більш жорсткої моделі комбінованого стресу імунопротекторний вплив рослин-адаптогенів проявляв себе у збільшенні інтенсивності і тривалості вірусіндукованого інтерфероноутворення та активації вже на ранніх етапах після інфікування функціональної активності К-клітин. Виразний протективний вплив фітоадаптогенів, зокрема родіоли рожевої, передусім на фактори клітинної резистентності, ймовірно, пояснюється наявністю антиоксидантних ефектів у цих рослин та їх можливою

Таблиця 2. Вплив фітоадаптогенів на цитопатогенну активність К-клітин крові мишей лінії СВА (n= 10-12), заражених після припинення дії стресу сублетальною дозою вірусу грипу А (M±m)

Група тварин			Цитопатогенна активність К-клітин крові після зараження через			
			2 доби	4 доби	7 діб	
Інтактні тварини			35,1±3,3	42,6±4,0	56,2±4,9	43,9±3,0
Ротаційний стрес	Контроль (H ₂ O)	38,2±4,1	40,4±2,8	57,2±4,0	48,1±4,4	
	Аралія	42,7±2,7	72,2±5,3*#	71,0±5,3*#	62,7±5,0*#	
	Елеутерокок	45,9±3,8*	74,7±3,8*#	67,8±4,9	65,7±5,8*#	
	Левзея	44,2±3,1*	65,3±6,0*#	68,2±6,0	60,8±4,1*#	
	Женьшень	35,7±3,7	70,4±4,1*#	76,4±4,2*#	66,8±2,9*#	
	Родіола	44,8±4,2*	77,5±5,9*#	75,4±5,4*#	70,2±5,5*#	
Комбінований стрес	Контроль (H ₂ O)	25,1±3,0*	20,2±3,3*	21,2±2,7*	18,3±3,4*	
	Аралія	38,1±4,5#	50,3±4,1#	52,1±1,9#	40,6±3,1#	
	Елеутерокок	39,6±4,0#	51,1±4,4#	50,3±4,1#	47,0±4,2#	
	Левзея	34,1±4,1#	44,2±4,0#	47,0±3,0*#	40,4±3,6#	
	Женьшень	34,3±2,9#	46,6±4,7#	50,7±4,5#	47,1±3,2#	
	Родіола	38,8±3,1#	55,8±4,2*#	55,3±4,8#	53,7±4,0*#	

Примітки. * – зміни достовірні порівняно з інтактною групою (P< 0,05); # – зміни достовірні порівняно з контрольною (H₂O) групою (P<0,05).

здатністю до нормалізації структурно-функціонального стану мембран імункомпетентних клітин, у тому числі й тих, що виконують ефекторну функцію [2, 8, 10].

Висновки. 1. Ротаційний стрес – це м'яка модель стресу, яка не впливає на природні механізми противірусного захисту і не змінює летальності мишей після їх інфікування сублетальною дозою патогенного штаму вірусу грипу А, тоді як корекція стресу фітоадаптогенами посилює природну вірусіндуковану стимуляцію гуморальних і клітинних факторів противірусної резистентності, зменшуючи летальність інфікованих після стресу тварин нижче показника інтактної групи.

2. Комбінований стрес – більш жорстка і пролонгована модель стресу, яка супроводжується депресією показників противірусного імунітету, втратою організму здатності відповідати активацією противірусних механізмів захисту у відповідь на вірусне інфікування та збільшенням летальності тварин в умовах їх зараження сублетальною вірусною інфекцією. Імунопротекторний вплив рослин-адаптогенів полягає у посиленні інтенсивності і тривалості вірусіндукованого інтерфероноутворення та активації вже на ранніх етапах після інфікування функціональної активності К-клітин, що більш ніж утричі зменшує летальність інфікованих після стресу тварин.

Література

1. Барнаулов О. Д. Введение в фитотерапию. – СПб:Лань, 1999. – 160 с.
2. Барнаулов О. Д., Поспелова М. Л., Барнаулова С. О. Ангиопротекторное и стресслимитирующее действие фитопрепаратов // Психофармакол. и биол. наркол. – 2005. – Т. 5, № 1. – С. 844–849.
3. Гейн С. В., Сятчихин А. А. Влияние ротационного стресса на развитие локального иммунного ответа у мышей, роль к-опиатных рецепторов // Пат. физ. и эксп. тер. – 2008. – № 3. – С. 13-15.
4. Гончаров А. Г., Фрейдлин И. С., Смирнов В. С. Основы клинической иммунологии и методологические подходы к оценке иммунного статуса: практикум. –

- Калининград: Изд-во КГУ, 1997. – 73 с.
5. Державна фармакопея України. – 1-ше вид. Додоповнення I. – Х.:ПРЕГ, 2004. – 494 с.
6. Павлушина С. В., Орлова Т. В. Ускоренный метод микротитрования интерферонов по задержке цитотоксического действия вируса везикулярного стоматита // Вопр. вирусологии. – 1981. – Т. 26, № 2. – С. 242-245.
7. Смолина Т. П., Орлова Т. Г., Щегловитова О. Н., Беседнова Н. Н. Интерферониндуцирующее действие полисахаридных биополимеров из корня и культуры клеток женьшеня // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 11. – С. 21-23.

8. Brown R., Gerbarg P., Ramazanov Z. Rhodiola rosea: A Phytomedicinal Overview // American Botanical Council. – 2002. – Vol. 56. – P. 40-52.
9. Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology // Brain, Behavior and Immunity.

– 2005. – Vol. 19, № 1. – P. 3-11.

10. Skopinska-Rozewska E., Bychawska M., Bialas-Chromiec B., Sommer E. The in vivo effect of Rhodiola rosea and Rhodiola quadrifida hydro-alcoholic extracts on chemokinetic activity of spleen lymphocytes in mice // Centr. Eur. J. Immunol. – 2009. – Vol. 34, № 1. – P. 42-45.

ВЛИЯНИЕ ФИТОАДАПТОГЕНОВ НА АНТИВИРУСНУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЖИВОТНЫХ ПРИ СТРЕССЕ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ И ИНТЕНСИВНОСТИ

И. В. Ковальчук, Я. В. Рожковский

Одесский государственный медицинский университет

Резюме: в опытах на мышах линии СВА установлено, что отвары подземной части растений-адаптогенов (аралия манчжурская, элеутерококк колючий, левзея сафлоровидная, женьшень, родиола розовая), которые вводились на протяжении 10 дней перорально в дозе 0,5 г/кг, усиливают природную активацию механизмов адаптации при ротационном стрессе и снижают негативное влияние комбинированного стресса на клеточные и гуморальные факторы антивирусной резистентности, усиливая интерференообразование и реакцию К-клеток крови в ответ на инфицирование вирусом гриппа А в послестрессовом периоде и существенно снижая летальность животных от вирусной инфекции.

Ключевые слова: фитоадаптогены, антивирусная резистентность, ротационный стресс, комбинированный стресс.

THE INFLUENCE OF PHYTOGENIC ADAPTOGENES ON ANTIVIRAL RESISTANCE OF ANIMALS IN THE STRESS OF DIFFERENT DURATION AND INTENSITY

I.V. Kovalchuk, Ya.V. Rozhkovskiy

Odessa State Medical University

Summary: in tests on CBA-line mice has been established, that decoctions of the underground part of phytogetic adaptogenes (Aralia mandshurica, Eleutherococcus senticosus, Leuzea carthamoides, Panax ginseng, Rhodiola rosea), which have been introduced for 10 days orally in a dose of 0,5 g/kg, reinforce the natural activation of adaptation mechanisms in rotational stress, and reduce the negative influence of the combined stress on cellular and humoral factors of antiviral resistance, increasing interferonogenesis and the reaction of blood K-cells in response to infection with influenza A virus after stress and significantly reducing the mortality of animals from viral infection.

Key words: phytogetic adaptogenes, antiviral resistance, rotational stress, combined stress.