

**КОНОВАЛОВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА**

**АНАЛИЗ АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ПЧЕЛИНОГО ЯДА К  
ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ И  
ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ**

03.00.13 – физиология

03.00.04 – биохимия

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Нижний Новгород

2009

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского и на кафедре биохимии им. Г. Я. Городисской Нижегородской государственной медицинской академии

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор  
**Корягин Александр Сергеевич**

доктор биологических наук, профессор  
**Ерлыкина Елена Ивановна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Конторщикова Клавдия Николаевна**

доктор биологических наук  
**Бояринова Лариса Валентиновна**

**Ведущая организация:** ГОУ ВПО «Омская государственная  
медицинская академия»

Защита диссертации состоится « 12 » \_\_\_\_\_ марта \_\_\_\_\_ 2009 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.12 при Нижегородском государственном университете им. Н. И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

Корягин А.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Роль гипоксии очень велика в развитии многих альтерирующих изменений в организме человека. Практически при всех нарушениях сердечно-сосудистой системы, лёгких, системы крови, отравлениях изменяется либо доставка, либо утилизация кислорода. Классические химически синтезированные антигипоксанты, обычно косвенно снижающие последствия гипоксических состояний, зачастую обладают симптоматическим действием и имеют серьезные побочные эффекты. В решении указанной проблемы большое значение принадлежит поиску натуральных адаптогенных средств, которые включают зоо- и фитопрепараты, в том числе и зоотоксины (Яременко, 2008).

В настоящее время известно три типа адаптационных реакций: стресс, реакция активации и реакция тренировки. Стресс развивается в ответ на действие сильных раздражителей, обычно неблагоприятных для организма (Селье, 1972, 1977). При стрессе, наряду с элементами защиты, имеются элементы повреждения. Реакция активации развивается в ответ на средние по силе воздействия. При продолжительном действии раздражителя средней силы развивается устойчивая (стойкая) активация (Гаркави и др. 1998). Реакция тренировки возникает при действии на организм относительно слабых раздражителей. В отличие от стресса изменения при реакции активации и тренировки по своему характеру близки к вариантам нормы. На этой стадии происходит повышение резистентности, обусловленной подъёмом активности защитных и регуляторных систем организма (Гаркави и др., 1990).

Пчелиный яд представляет собой многокомпонентную систему, и, соответственно, может одновременно воздействовать на многие регуляторные и исполнительные системы организма. Хорошо известно, что малые дозы пчелиного яда оказывают радиозащитное действие, причем в его основе лежат механизмы развития неспецифической адаптационной реакции активации ((Корягин, Ерофеева, 2004; Корягин, 2007). Необходимо отметить, что исследований по изучению адаптогенных эффектов малых доз пчелиного яда к условиям действия других экологических неблагоприятных факторов, в частности, вызывающих развитие гипоксии, практически не проводилось.

В связи с высокой аллергенной и антигенной активностью пчелиного яда внутрибрюшинное введение зоотоксинов является малоперспективным в практической медицине. Более предпочтительным и общепризнанным методом применения препаратов является пероральный. Однако, поскольку яд пчелы имеет белково-пептидную природу и способен разрушаться протеазами пищеварительного тракта, его введение через рот в организм малоэффективно. Одним из вариантов решения этой задачи является пероральное введение зоотоксинов в составе нанокомпозитов, созданных на основе хитозана и наночастиц золота, способных связывать яд, предотвращать его разрушение, а также облегчать транспортировку в кровь через внутренний эпителиальный барьер кишечника (Таламанова и др., 2008).

Система крови является интегративной системой, наиболее полно отражающей состояние и характер метаболизма всего организма. Она играет решающую роль в развитии неспецифических и специфических реакций защиты организма. Кровь легко доступна для динамического и комплексного анализа. В качестве основных индикаторных показателей типа адаптационных реакций используют лейкоцитарную формулу и лейкоцитарный коэффициент (отношение между процентным содержанием лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов). Данные параметры гомеостаза крови достаточно полно отражают состояние важнейших физиологических систем и используются в качестве критериев адаптационных реакций организма (Васильев и др., 1992).

Вышеизложенное указывает на важность исследований по изучению адаптогенных свойств яда пчелы и нанокompозитов, содержащих зоотоксины пчелы к условиям гипобарической гипоксии.

### **Цель исследования**

Проведение анализа адаптогенного действия яда пчелы медоносной (*Apis mellifera* L.) к условиям гипобарической гипоксии, оцениваемого по показателям системы крови лабораторных животных, при курсовом внутрибрюшинном введении пчелиного яда и пероральном применении нанокompозитов, содержащих зоотоксины пчелы.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать состояние свободнорадикальных процессов, антиоксидантного статуса плазмы крови, некоторых ферментов энергетического обмена и форменных элементов крови при курсовом внутрибрюшинном введении пчелиного яда экспериментальным животным в дозах, вызывающих развитие адаптационной реакции устойчивой активации.

2. Оценить возникновение резистентности экспериментальных животных к гипобарической гипоксии по показателям системы крови, активности процессов перекисного окисления липидов и активности ферментов энергетического обмена при предварительном курсовом внутрибрюшинном введении пчелиного яда.

3. Определить тип адаптационной реакции и изучить ее формирование у экспериментальных животных по показателям системы крови и свободнорадикального окисления при курсовом пероральном введении нанокompозитов, содержащих зоотоксины пчелы.

4. Установить возникновение резистентности к гипобарической гипоксии лабораторных животных при предварительном пероральном введении нанокompозитов, содержащих пчелиный яд, по показателям системы крови, свободнорадикальных процессов и активности ферментов энергетического обмена.

### **Научная новизна исследования**

Впервые показано, что внутрибрюшинное курсовое введение лабораторным животным раствора яда пчелы (0,1 мг/кг), вызывающее в условиях нормоксии развитие неспецифической адаптационной реакции устойчивой активации, сопровождается снижением интенсивности свободнорадикальных процессов, увеличением мощности антиоксидантной системы организма, повышением активности фермента энергетического обмена сукцинатдегидрогеназы.

Впервые установлено, что реакция устойчивой активации, развивающаяся непосредственно после окончания курсового внутрибрюшинного введения пчелиного яда (0,1 мг/кг) характеризуется резистентностью к барометрической гипоксии.

Впервые выявлено, что при курсовом пероральном введении нанокompозитов, содержащих зоотоксины пчелы, реакция активации и резистентность к гипоксии формируются в течение недели после окончания применения препаратов.

### **Научно-практическая значимость**

Полученные результаты расширяют представления о физиологических механизмах адаптации и поддержания постоянства внутренней среды организма в условиях гипоксии. Выявленные адаптогенные свойства раствора пчелиного яда (0,1 мг/кг) в условиях моделирования гипобарической гипоксии дополняют знания о молекулярных механизмах реагирования организма на возникающий дефицит кислорода. Обнаруженные адаптогенные эффекты нанокompозитов, содержащих зоотоксины пчелы, открывают перспективу их профилактического применения с целью повышения адаптационной устойчивости организма в условиях гипоксии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Адаптационная реакция устойчивой активации, вызванная курсовым внутрибрюшинным введением яда пчелы (0,1 мг/кг) крысам, сопровождается снижением интенсивности свободнорадикальных процессов, усилением мощности антиоксидантной системы плазмы крови и увеличением активности энергетических процессов.

2. Реакция устойчивой активации развивается непосредственно после окончания внутрибрюшинных инъекций пчелиного яда (0,1 мг/кг) лабораторным животным и характеризуется повышением толерантности к гипобарической гипоксии.

3. Курсовое пероральное введение нанокompозитов, содержащих пчелиный яд, экспериментальным животным вызывает развитие неспецифической адаптационной реакции устойчивой активации спустя неделю после окончания применения препаратов.

4. Реакция устойчивой активации, возникающая при курсовом пероральном введении нанокompозитов, содержащих пчелиный яд (доза 0,5

мг/кг), приводит к возникновению резистентности животных к гипобарической гипоксии.

### **Апробация работы**

Результаты работы были доложены и обсуждены на XIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2007), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии», посвященной 20-летию Кировской государственной медицинской академии (Киров, 2007), Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения д.б.н., проф. Сапожниковой Е.В. (Саранск, 2008), XIII Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2008), Нижегородском биохимическом обществе (Нижний Новгород, 2008).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 126 страницах, включая список литературы, и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, приложения и библиографического указателя. Список цитируемой литературы содержит 147 источников. Диссертация иллюстрирована 37 таблицами, 16 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа была выполнена на 217 беспородных крысах-самцах массой 250-300 г, выращенных в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещенности. Во всех сериях опытов в каждой группе было по 7 животных. Кровь для анализа брали из подъязычной вены крыс.

В ходе исследований проведено *in vivo* 4 серии экспериментов (табл.1).

В первой серии экспериментов яд пчелы в объеме 0,2 мл (дозой 0.1 мг/кг, вызывающей развитие реакции активации (Корягин, Ерофеева, 2004)) вводили животным внутрибрюшинно в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. Животным контрольных групп вводили растворитель пчелиного яда - физиологический раствор. После окончания серии инъекций через сутки определяли в крови количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, значение лейкоцитарного коэффициента, количество эритроцитов и концентрацию гемоглобина, количество клеток костного мозга в бедренной кости. Используя метод  $Fe^{2+}$  индуцированной биохемилюминесценции, оценивали интенсивность процесса СРО и активность антиоксидантной системы в плазме крови, также определяли концентрацию диенов, триенов, оснований Шиффа, активность супероксиддисмутазы и концентрацию церулоплазмينا. Спектрофотометрически определяли активность ферментов энергетического обмена - сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы.

Во второй серии экспериментов после окончания введений яда крыс подвергали действию гипобарической гипоксии (условная высота 8 тыс. м) в

течение 30 минут (данные параметры использовались во всех экспериментах). Сразу после моделирования состояния гипоксии определяли концентрацию диеновых, триеновых конъюгатов, оснований Шиффа, показатели  $Fe^{2+}$  индуцированной биохемиллюминесценции, концентрацию малонового диальдегида, содержание пировиноградной и молочной кислот, а также активность сукцинатдегидрогеназы в крови. На следующие сутки после моделирования состояния гипоксии определяли содержание лейкоцитов и количество клеток костного мозга в бедренной кости, лейкоцитарную формулу и лейкоцитарный коэффициент, количество эритроцитов и концентрацию гемоглобина.

Таблица 1

## Общее количество животных и их распределение по сериям

№	Серии исследований	Количество животных
1.	Исследование состояния свободнорадикальных процессов, антиоксидантного статуса плазмы крови, некоторых ферментов энергетического обмена и показателей крови при курсовом внутрибрюшинном введении малой дозы пчелиного яда, вызывающих возникновение адаптационной реакции активации в условиях нормоксии.	21
2.	Определение возникновения резистентности экспериментальных животных к гипоксии при предварительном курсовом внутрибрюшинном введении раствора пчелиного яда.	56
3.	Установление типа адаптационной реакции при курсовом пероральном введении нанокompозитов, содержащих пчелиный яд, в условиях нормоксии.	84
4.	Изучение возникновения резистентности крыс к условиям гипобарической гипоксии при предварительном курсовом пероральном введении нанокompозитов.	56
Общее количество животных		217

В третьей серии экспериментов дозы пчелиного яда, вводимые в составе нанокompозитов, составляли 0.5 и 1 мг/кг (Таламанова и др., 2008). Смесь наночастиц вводили перорально при помощи зонда в объеме 1 мл в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. Контрольный раствор содержал наночастицы золота и хитозан. На 1, 7 и 14 сутки после окончания введения нанокompозитов крыс подвергали воздействию гипобарической гипоксии. На следующий день после моделирования гипоксии были определены следующие показатели: количество лейкоцитов в крови,

лейкоцитарная формула и лейкоцитарный коэффициент, количество эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови, а также показатели биофлюоресценции плазмы крови.

Растворы нанокompозитов, состоящие из натуральных компонентов, были получены по методике, описанной Смирновой и др. (2005) и предоставлены кафедрой высокомолекулярных соединений и коллоидной химии химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Хитозан использовали с молекулярной массой 120 кДа и степенью деацетилирования 0,82 в дозе 50 мг/кг. Вводимая доза золота составляла 0.5 мг/кг. Средний размер наночастиц золота в нанокompозите находился в пределах 10-15 нм. Система сохраняла устойчивость не менее 3 месяцев (Якимович, 2007). Хитозан в составе нанокompозитов выполняет восстановительную и стабилизирующую функцию (Якимович, 2008).

В четвертой серии экспериментов нанокompозиты вводили в течение 7 суток. Через сутки и через неделю после окончания инъекций крыс помещали в условия гипобарической гипоксии. Анализ крови проводили на следующий день после экспозиции в барокамере. По показателям лейкоцитарной формулы, красной крови, активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ферментов энергетического обмена судили о характере адаптационных эффектов нанокompозитов на специфическую резистентность, которую оценивали в условиях гипобарической гипоксии.

*Общее количество лейкоцитов* определяли с помощью камеры Горяева. (Ронин, Старобинец, 1989); *подсчет лейкоцитарной формулы* – с окраской мазков по Романовскому-Гимзе (Меньшиков и др., 1987); *количество клеток костного мозга* в бедренной кости – методом П.Д. Горизонтова (1983); *подсчет числа эритроцитов* – фотоэлектроколориметрическим методом (Меньшиков и др., 1987); *концентрацию гемоглобина* – гемиглобинцианидным методом (Меньшиков и др., 1987).

*Интенсивность свободнорадикального окисления* определяли методом индуцированной биофлюоресценции (БХЛ) (Кузьмина, 1983); *продукты ПОЛ* (диеновые, триеновые конъюгаты, основания Шиффа) – в гептан-изопропанольных фракциях (Стальная, 1977; Волчегорский, 1989); *концентрацию малонового диальдегида* в крови – по стандартной методике (Владимиров, Арчаков, 1972); *определение содержания церулоплазмينا* осуществлялось по методике, описанной В.Г. Колб, В.С. Камышниковым (1976).

*Активность супероксиддисмутазы* определяли по методу С. Чевари (1985); *сукцинатдегидрогеназы (СДГ)* в крови - по методу Н.Д. Ещенко, Г.Г. Вольского (1982); *лактатдегидрогеназы (ЛДГ)* – по Кочетову (1971). *Количественное определение пирувата и лактата* проводили энзиматическим методом Хохорста (Асатиани, 1965; Bergmeyer, 1974).

Результаты исследований статистически обрабатывали с помощью программы BIOSSTAT (Гланц, 1998). Независимые выборки сравнивали с



помощью однофакторного дисперсионного анализа, непараметрических критериев Крускала-Уоллиса и Ньюмена-Кейлса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Исследование состояния свободнорадикальных процессов, антиоксидантного статуса плазмы крови и ферментов энергетического обмена крови при курсовом внутрибрюшинном введении пчелиного яда**

Многочисленные исследования функционального состояния тканевых, клеточных и внутриклеточных структур жизненно важных систем организма свидетельствуют о том, что под влиянием неблагоприятных факторов на уровне указанных компонентов возникают деструктивные изменения, в основе которых лежит усиление процессов свободнорадикального и перекисного окисления (Митрохин и др., 1991). Одним из проявлений адаптогенной активности препаратов следует считать их антиоксидантное действие, поскольку защита организма от разного рода повреждений в значительной степени связана и сопровождается повышением антиоксидантного потенциала организма (Яременко, 2008).

Через сутки после окончания внутрибрюшинного введения пчелиного яда, вызывающего в условиях нормоксии развитие реакции активации, у животных опытной группы отмечалось статистически значимое снижение показателя светосуммы *S* биохемилюминесценции ( $p < 0,05$ ), который отражает суммарную активность процессов свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы по сравнению с контрольными и интактными животными (табл. 2).

*Таблица 2*

### **Светосумма *S* (за 30 сек) и содержание продуктов перекисного окисления липидов (отн. ед. опт. пл.) в крови крыс на следующие сутки после внутрибрюшинного введения пчелиного яда (0.1 мг/кг)**

Показатель	Интактные	Контроль (физ. раствор)	Опыт (пчелиный яд)
<i>S</i> , за 30 сек	92,38±5,21	92,32±1,58	79,05±1,58*#
Диеновые конъюгаты, отн. ед. оп. пл.	0,330±0,032	0,146±0,035*	0,186±0,013*
Триеновые конъюгаты, отн. ед. оп. пл.	0,267±0,010	0,132±0,014*	0,124±0,010*
Основания Шиффа, отн. ед. оп. пл.	0,025±0,002	0,019±0,003	0,007±0,002*#

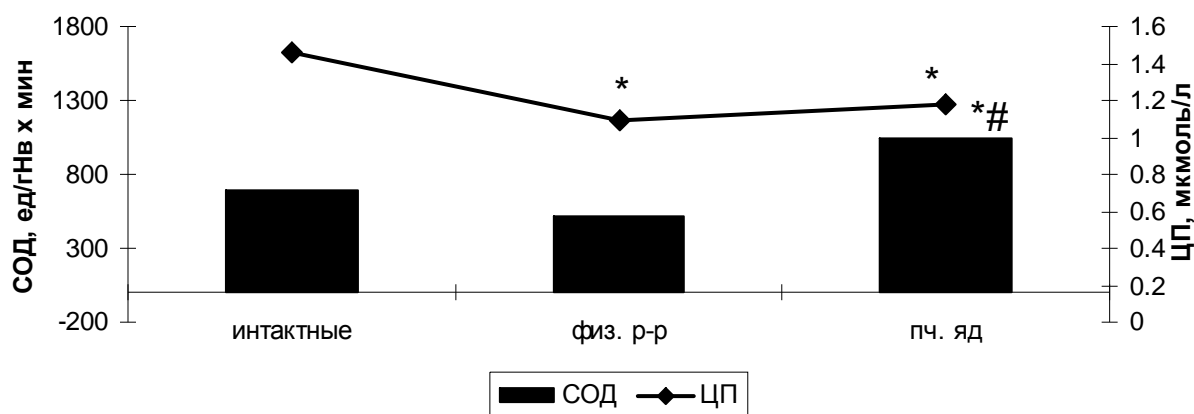
*Примечание:* статистически значимые отличия: \*-  $p < 0,05$  по отношению к интактным; # -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Данные биохемилюминесценции подтверждаются измерениями содержания продуктов ПОЛ. Уровень диеновых и триеновых конъюгатов в

крови статистически значимо снижался ( $p < 0,05$ ) у животных, которым вводили как физиологический раствор, так и яд относительно интактных (табл. 2). Содержание оснований Шиффа не изменялось в контроле в ответ на введение физиологического раствора. В опытной группе при введении пчелиного яда этот показатель статистически значимо снижался как относительно интактных, так и относительно контрольных животных. Диеновые и триеновые конъюгаты не являются стойкими соединениями, они быстро метаболизируют в основания Шиффа, поэтому уровень оснований Шиффа, вероятно, является более информативным показателем.

Исследование состояния антиоксидантной системы показало, что активность супероксиддисмутазы (СОД) увеличивалась в ответ на введение яда (рис. 1). При введении пчелиного яда отмечается активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (Артемов, 1969). Восстановление цитохрома  $P_{450}$ , происходящее при гидроксировании в процессе синтеза стероидных гормонов, в частности кортизола, сопровождается активацией кислорода. Образующийся при этом супероксид-анион-радикал  $O_2^-$  возможно индуцирует синтез фермента антиоксидантной системы защиты СОД.

Выявлено, что концентрация церулоплазмينا статистически значимо снижалась у контрольных и опытных животных относительно интактных ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). По мнению Н.К. Зенкова с сотр. (2001), церулоплазмин выступает в качестве донора меди для других медьсодержащих белков, в частности СОД. Способность церулоплазмينا окислять ионы  $Fe^{2+}$ , а также ингибировать ОН-радикалы делает его наиболее эффективным сывороточным ингибитором активных форм кислорода (АФК) (Зенков и др., 2001).



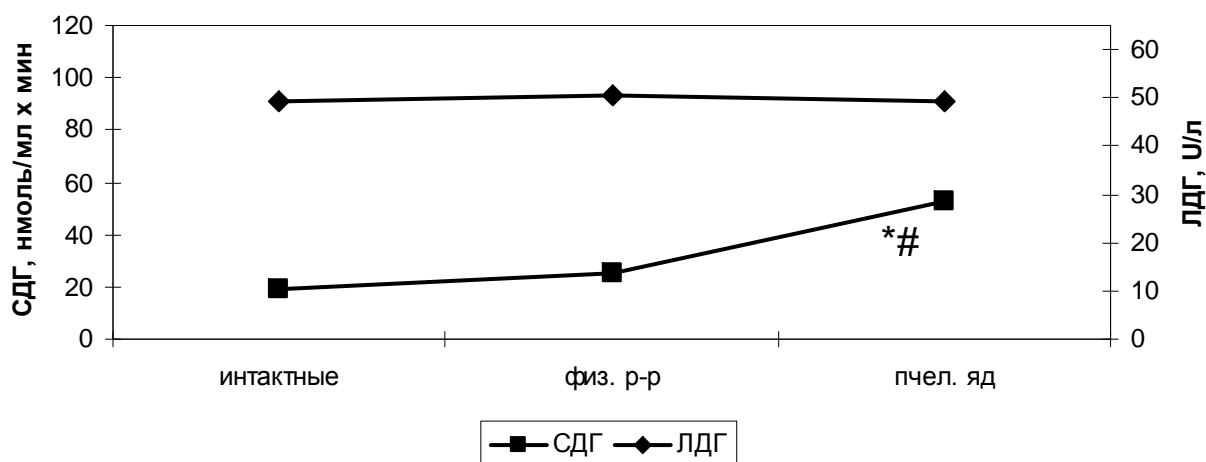
**Рис. 1.** Активность супероксиддисмутазы (ед/г Нв x мин) и концентрация церулоплазмينا (мкмоль/л) в крови крыс через сутки после курсового внутрибрюшинного введения пчелиного яда (0.1 мг/кг)

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным; # -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Исследованные показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты свидетельствуют о том, что курсовое введение

пчелиного яда экспериментальным животным сопровождается снижением интенсивности процессов ПОЛ и повышением активности антиоксидантной системы защиты крови организма экспериментальных животных.

Исследование ферментов энергетического обмена клеток крови на следующие сутки после окончания введения препарата показало, что пчелиный яд практически не изменяет активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в крови по сравнению с контрольной группой и вызывает статистически значимое увеличение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в 2,7 раз (рис. 2). Это согласуется с данными Гаркави Л.Х. и др. (1998), сообщающими, что при реакции активации в лимфоцитах значительно повышается активность СДГ.



**Рис. 2.** Активность СДГ (нмоль/мл x мин) в крови и ЛДГ (U/l) в плазме крови крыс на следующие сутки после окончания курсового внутрибрюшинного введения пчелиного яда (0.1 мг/кг)

*Примечание:* статистически значимые отличия: \*-  $p < 0,05$  по отношению к интактным; # -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Таким образом, реакция активации, развивающаяся в ответ на внутрибрюшинное введение пчелиного яда в дозе 0,1 мг/кг, способствовала снижению интенсивности ПОЛ, активации антиоксидантной системы, что было отражено в снижении светосуммы S биохемилюминесценции, снижении концентрации оснований Шиффа, наблюдаемом увеличении активности СОД. Известно, что введение малых доз пчелиного яда характеризуется дополнительным синтезом глюкокортикоидов в надпочечниках. Синтез кортизола сопровождается выделением небольшого числа активных форм кислорода, которые могут участвовать в индукции ферментов антиоксидантной системы организма, в частности и супероксиддисмутазы.

Резкое увеличение активности СДГ указывает на активацию процессов окисления и свидетельствует о возможном энергостимулирующем эффекте пчелиного яда. Данный эффект, вероятно, можно также объяснить активацией симпатoadреналовых механизмов при введении пчелиного яда и усилением потребления кислорода организмом (Крылов, 2008), что несомненно

стимулирует работу электронпереносящей цепи, и в частности второй митохондриальный комплекс.

### **Определение возникновения состояния устойчивости к гипоксии при внутрибрюшинном введении пчелиного яда**

При моделировании гипобарической гипоксии (подъем на условную высоту 8 тыс. м) установлено увеличение в крови контрольных крыс («гипоксия») общего количества лейкоцитов на 66% по сравнению с этим показателем у интактных животных ( $p < 0,05$ ) (табл. 3). Изучение лейкоцитарной формулы показало, что у животных группы «гипоксия» и «гипоксия + физ. раствор» наблюдались лимфопения и нейтрофильный лейкоцитоз, лейкоцитарный коэффициент в данных группах был статистически значимо ниже на 64%, чем у интактных (табл. 3). Это свидетельствует о формировании у контрольных групп животных состояния типичной стресс-реакции (Горизонтов, 1983; Гаркави, 1990; Барабой, 2006). Вероятно, лейкоцитоз в периферической крови при стрессе связан, кроме мобилизации пристеночного пула клеток, также и с выходом зрелых лейкоцитов из костного мозга. В пользу этого указывает снижение количества клеток костного мозга в бедренной кости крыс в контрольных группах на 41% по сравнению с интактными животными (табл. 3). По мнению О.К. Гаврилова с сотр. (1985), при стресс-реакции глюкокортикоиды вызывают нейтрофилез за счет усиления поступления зрелых нейтрофилов из костного мозга в кровь.

*Таблица 3*

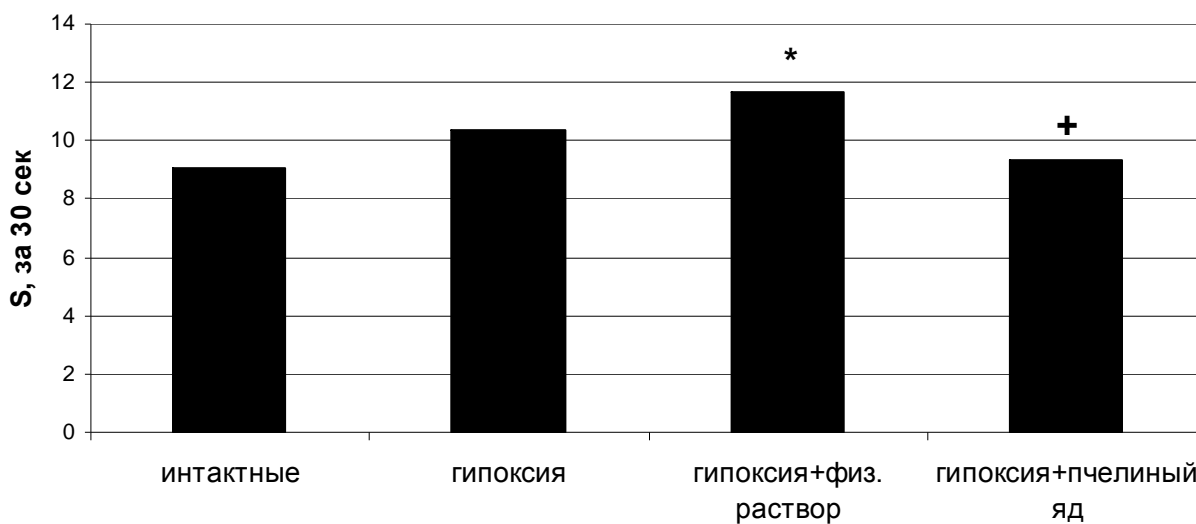
### **Общее содержание лейкоцитов в периферической крови крыс и количество клеток костного мозга в бедренной кости после гипоксии при предварительном внутрибрюшинном введении пчелиного яда (0.1 мг/кг)**

Показатель	Интактные	Контроль (гипоксия)	Контроль (гипоксия+ физ. раствор)	Опыт (гипоксия+ р-р пч. яда)
Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л	16,65 $\pm$ 1,14	27,60 $\pm$ 2,41*	23,05 $\pm$ 1,17	18,37 $\pm$ 0,58
Лимфоциты, %	77,63 $\pm$ 0,75	63,86 $\pm$ 1,60*	60,14 $\pm$ 3,76*	72,88 $\pm$ 3,38#+
Сегментоядерные нейтрофилы, %	10,50 $\pm$ 0,57	24,07 $\pm$ 1,72*	24,43 $\pm$ 2,29*	16,44 $\pm$ 2,29*#+
Лейкоцитарный коэффициент	7,39 $\pm$ 0,24	2,65 $\pm$ 0,13*	2,64 $\pm$ 0,21*	4,43 $\pm$ 0,41*##+
Клетки костного мозга, $\times 10^6$ в 1 бедр. к.	8.88 $\pm$ 0.61	5.25 $\pm$ 0.25*	5.20 $\pm$ 0.26*	7.77 $\pm$ 0.61##+

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе «гипоксия»; + -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

У животных, которым предварительно вводили пчелиный яд, подъем на высоту не приводил к возникновению стресса, что подтверждается сохранением содержания лейкоцитов равным таковому у интактных крыс (табл. 3). Количество лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов в опытной группе приближались к соответствующим показателям интактной группы животных. Количество клеток костного мозга в бедренной кости в опытной группе статистически значимо не отличалось от этого показателя у интактных животных (табл. 3). Данные показатели свидетельствуют об адаптированности животных к используемым условиям гипобарической гипоксии.

При оценке интенсивности свободнорадикальных процессов по показателям биохемилюминесценции (рис. 3) в условиях гипоксии было установлено незначительное увеличение светосуммы  $S$  в контрольной группе животных, которой вводили физиологический раствор, что свидетельствует об активации свободнорадикального окисления. Вероятно, что при гипобарической гипоксии наиболее выражена стадия тревоги стресса с высоким уровнем адреналина в крови, на которую накладывается болевая реакция на инъекцию раствора.



**Рис. 3.** Светосумма  $S$  (за 30 сек) в плазме крови крыс после гипобарической гипоксии при предварительном внутрибрюшинном введении пчелиного яда (0.1 мг/кг)

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* -  $p < 0.05$  по отношению к интактным животным; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе «гипоксия»; + -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Показатель светосуммы  $S$ , позволяющий оценить интенсивность свободнорадикальных процессов, достоверно снижался в опытной группе по сравнению с данным показателем у контрольных животных на 20% и сохранялся на уровне интактных. В опытной группе скорость нарастания

перекисного окисления ниже, чем в контрольной, что свидетельствует в пользу того, что адаптационная реакция в опытной группе животных является антистрессорной.

Можно полагать, что более слабые, чем стрессорные раздражители при многократном воздействии, также как и стрессорные, увеличивают мощность стресс-лимитирующих систем и формируют «феномен адаптационной стабилизации структур» (ФАСС), который проявляется в высокой устойчивости внутриклеточных компонентов к неблагоприятным воздействиям (Меерсон, Малышева, 1993). В настоящее время предполагают участие данного феномена в развитии резистентности к повреждающим факторам и при других неспецифических реакциях (к гипоксии в том числе) (Гаркави, 1998). Развитие ФАСС связано с накоплением в клетках белков теплового шока, синтез которых значительно возрастает после длительных или многократных воздействий (Меерсон, 1992). Усиление синтеза белков теплового шока индуцируется катехоламинами и кортикостероидами, образование которых усиливается при введении пчелиного яда. Феномен адаптационной стабилизации структур связан с механизмами долговременной адаптации.

#### **Определение типа адаптационной реакции при курсовом пероральном введении нанокompозитов, содержащих пчелиный яд, экспериментальным животным в условиях нормоксии.**

Задачей данной серии эксперимента являлось определение типа неспецифической адаптационной реакции при курсовом пероральном введении зоотоксинов пчелы в составе нанокompозитов по физиолого-биохимическим показателям системы крови и активности СРО. Для её решения был осуществлен анализ показателей лейкоцитарной формулы и индуцированной биохемилюминесценции плазмы крови. Проведено исследование действия двух доз пчелиного яда в составе нанокompозитов: 0,5 и 1 мг/кг.

Анализ параметров крови (общее количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула) и интенсивности свободнорадикального окисления выявил, что через сутки после окончания перорального введения нанокompозитов формирование адаптационной реакции развивается не полностью, так как заметного процесса изменения активности свободнорадикального окисления не происходило. Поэтому для выявления сроков полного формирования адаптационной реакции увеличили временной интервал и проводили исследование тех же показателей через неделю после окончания введения нанокompозитов, содержащих пчелиный яд.

Изучение показателей белой крови через 7 суток после окончания введения препарата позволило выявить, что содержание лейкоцитов в данном эксперименте в исследуемых группах сохранялось на одном уровне с интактными животными (табл. 4). В контрольной группе наблюдалось статистически значимое увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов на 21% относительно интактных крыс. Лейкоцитарный

коэффициент в контрольной группе относительно интактных животных не изменялся. Вероятно, у крыс контрольной группы формируется неспецифическая реакция тренировки.

Таблица 4

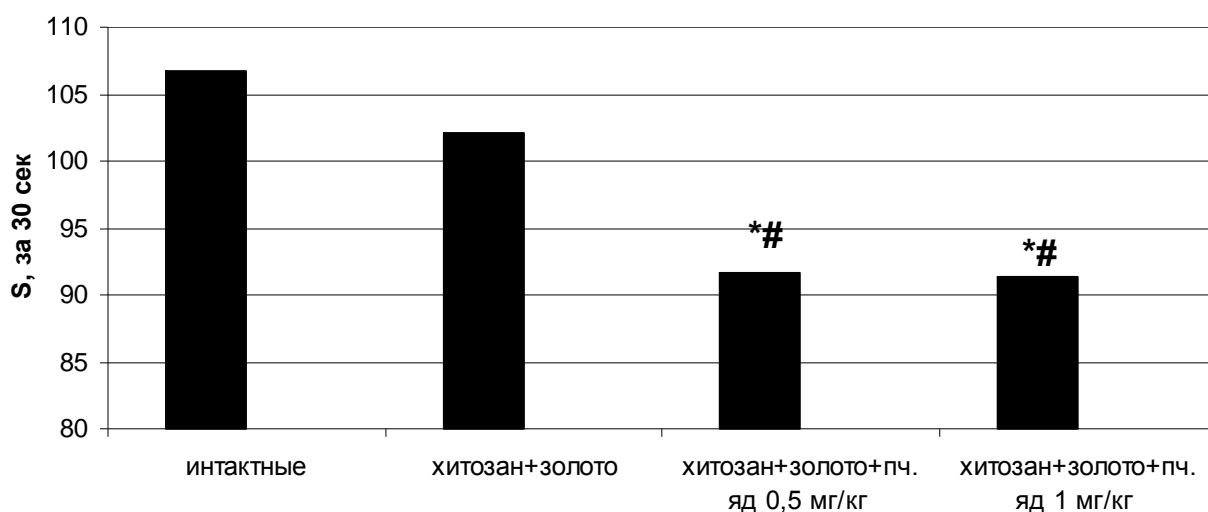
**Содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула в крови крыс через 7 суток после окончания перорального введения препаратов пчелиного яда**

Показатель	Интактные	Контроль (хитозан + золото)	Опыт (хитозан + золото + пчел. яд, 0,5 мг/кг)	Опыт (хитозан + золото + пчел. яд, 1 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л	13,48 $\pm$ 1,69	14,16 $\pm$ 1,29	10,96 $\pm$ 0,44	13,32 $\pm$ 2,01
Сегментоядерные нейтрофилы, %	18,34 $\pm$ 0,80	22,20 $\pm$ 1,51*	13,60 $\pm$ 0,38*#	17,34 $\pm$ 1,65#+
Лимфоциты, %	74,66 $\pm$ 0,31	74,08 $\pm$ 1,65	82,64 $\pm$ 0,74*#	79,78 $\pm$ 2,01*#
Лейкоцитарный коэффициент	4,09 $\pm$ 0,17	3,42 $\pm$ 0,33	6,11 $\pm$ 0,23*#	4,85 $\pm$ 0,61#+

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным; # -  $p < 0,05$  по отношению к контролю, + -  $p < 0,05$  по отношению к 1 опытной группе.

В обеих опытных группах количество лимфоцитов статистически значимо увеличивалось соответственно на 11% и 7%, а относительное содержание сегментоядерных нейтрофилов уменьшалось только в опытной группе (с дозой пчелиного яда 0,5 мг/кг в составе нанокмполитов) на 26% относительно интактных животных ( $p < 0,05$ ). Лейкоцитарный коэффициент статистически значимо повышался в данной опытной группе на 49% относительно исходного показателя ( $p < 0,05$ ). Во второй опытной группе количество сегментоядерных нейтрофилов оставалось на уровне интактных крыс, а также наблюдалась тенденция к увеличению лейкоцитарного коэффициента относительно этой группы животных. Таким образом, в опытных группах развивается реакция активации, причем в опытной группе с дозой пчелиного яда 0,5 мг/кг в составе нанокмполитов адаптационная реакция более выражена.

Через 7 суток после окончания введения препарата в контрольной группе не наблюдалось статистически значимых изменений свободнорадикального окисления относительно интактных. Однако в опытных группах отмечалось статистически значимое снижение активности свободнорадикального окисления. Показатель светосуммы S БХЛ снижался в опытных группах относительно интактных в равной степени на 14% (рис. 4).



**Рис. 4.** Светосумма S плазмы крови крыс через 7 суток после окончания перорального введения препаратов

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным; # -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Таким образом, через неделю после перорального введения нанокompозитов организм животных находился в состоянии наибольшей степени адаптированности. В использованных дозах пчелиный яд в составе нанокompозитов вызывал развитие неспецифической реакции активации. Однако нанокompозиты с дозой 0,5 мг/кг оказывали более выраженную адаптационную реакцию. Введение нанокompозитов обеим опытным группам вызывало индукцию антиоксидантной системы организма через 7 суток после окончания введения препаратов.

#### **Определение возникновения состояния устойчивости к гипоксии при пероральном введении нанокompозитов, содержащих пчелиный яд**

Сравнивая действие двух доз пчелиного яда в составе нанокompозитов (0,5 и 1 мг/кг) при применении в условиях нормоксии, нами найдено, что наиболее эффективной является доза 0,5 мг/кг. Наши исследования также показали, что в отличие от развития адаптационной реакции через сутки после внутрибрюшинного введения пчелиного яда формирование состояния устойчивой активации при пероральном применении в условиях нормоксии достигается через 7 суток после окончания использования препаратов. Поэтому в данном эксперименте использовалась доза пчелиного яда 0,5 мг/кг в составе нанокompозитов, и животных подвергали гипобарической гипоксии через 7 суток после окончания перорального введения нанокompозитов.

Было выявлено, что количество лейкоцитов в крови крыс, находившихся в условиях гипоксии, через 7 суток после окончания введения препаратов повышалось одинаково во всех группах, подвергавшихся гипоксии, по сравнению с интактными животными (табл. 5). Это свидетельствует о развитии реакции системы крови на гипоксическое повреждение.



**Содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула в крови крыс при моделировании гипобарической гипоксии через неделю после окончания перорального введения нанокompозитов, содержащих пчелиный яд**

Показатель	Интактные	Контроль (гипоксия)	Контроль (гипоксия+ хитозан - золото)	Опыт (гипоксия+ хитозан-золото-пч. яд 0.5 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л	16.65 $\pm$ 1.14	27.60 $\pm$ 2.41*	28.44 $\pm$ 3.95*	28.44 $\pm$ 1.71*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	12,75 $\pm$ 0,92	22,50 $\pm$ 2,07*	16,17 $\pm$ 1,17	12,50 $\pm$ 1,17#+
Лимфоциты, %	73,50 $\pm$ 2,13	57,50 $\pm$ 4,15*	64,70 $\pm$ 2,97	69,30 $\pm$ 3,11#
Лейкоцитарный коэффициент	6,01 $\pm$ 0,68	2,56 $\pm$ 0,21*	4,00 $\pm$ 0,24*	5,80 $\pm$ 0,69#+

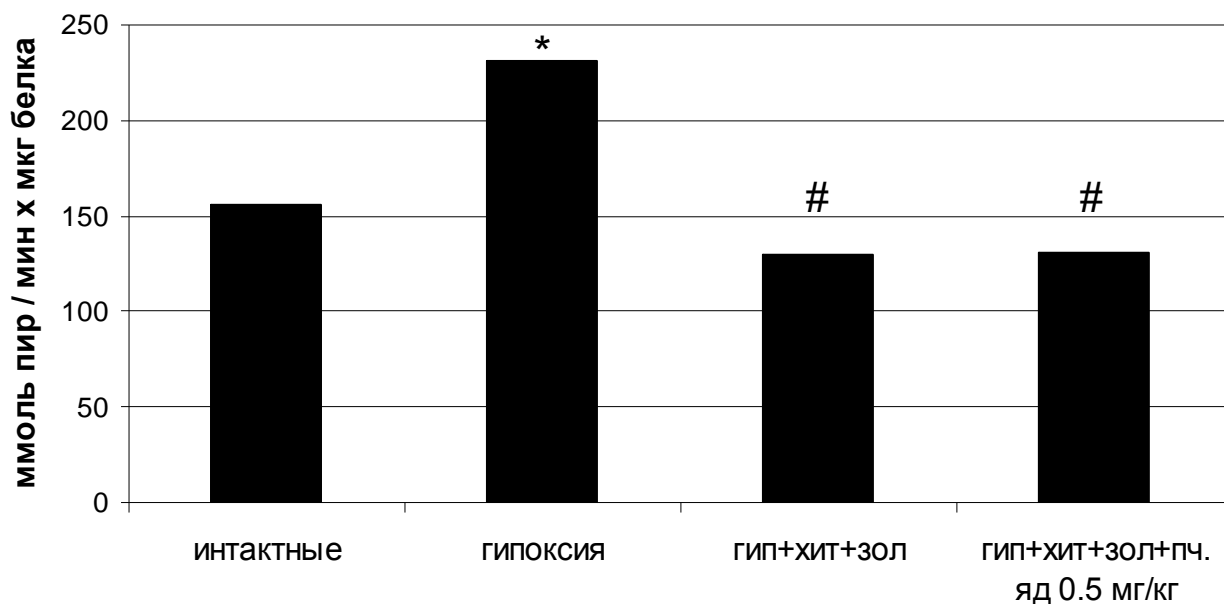
*Примечание:* статистически значимые отличия: \* -  $p < 0.05$  по отношению к интактным животным; # -  $p < 0,05$  по отношению к контролю (гипоксия).

Изучение относительного содержания разных форм лейкоцитов показало лимфопению и сегментоядерный нейтрофилез, а также снижение значения лейкоцитарного коэффициента в контрольной группе на гипоксию относительно интактных крыс (табл.5). Это свидетельствует о развитии стресс-реакции в контрольной группе в ответ на гипоксию. В другой контрольной группе животных, которой вводили препарат хитозан+золото, было зафиксировано статистически значимое снижение лейкоцитарного коэффициента относительно интактных, но в меньшей степени, чем в контрольной группе «гипоксия». Также в данной группе выявлена четкая тенденция к лимфопении и нейтрофилезу. Это указывает на адаптационный ответ с меньшими признаками повреждения, чем в группе «гипоксия». В опытной группе количество лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и лейкоцитарный коэффициент оставались на уровне соответствующих показателей интактных животных. Это свидетельствует об адаптированности опытных животных, находящихся в условиях реакции устойчивой активации к действию повреждающего влияния гипоксического фактора по сравнению с контрольными животными.

Существенному изменению при гипоксии подвергается активность лактатдегидрогеназы в плазме крови. Активность ЛДГ в контрольной группе («гипоксия») увеличивалась на 48% ( $p < 0,05$ ) (рис. 5). Нарушение метаболизма углеводов, а именно резкое его усиление по пути анаэробного гликолиза, помимо снижения количества синтезируемой АТФ, приводит к накоплению молочной кислоты. Накопление восстановленных эквивалентов в клетке ограничивает утилизацию лактата через окисление его в пируват (Хватова, Мартынов, 1977).

Снижение активности фермента ЛДГ в контрольной «хитозан + золото» и опытной «хитозан+золото+пчелиный яд» группах через неделю после

окончания перорального введения свидетельствует о переключении метаболизма по пути полного окисления пирувата в условиях дефицита кислорода (рис. 5)



**Рис. 5.** Активность ЛДГ (ммоль пирувата/ мин x мкг белка) в плазме крыс через неделю после курсового перорального введения наноконпозитов в условиях гипобарической гипоксии

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* -  $p < 0.05$  по отношению к интактным животным; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе «гипоксия».

Таким образом, наши исследования показывают, что устойчивость к гипоксии при пероральном способе введения препаратов развивается через 7 дней после окончания введения препаратов. Вероятно, процессы всасывания компонентов наноконпозитов, развитие реакции крови, а также индукция антиоксидантной системы требуют определенного периода времени, большего, чем при внутрибрюшинном введении пчелиного яда.

Следовательно, курсовое пероральное введение наноконпозитов, содержащих пчелиный яд, оказывает адаптогенное действие, что свидетельствует о перспективности их профилактического применения с целью повышения адаптационных возможностей организма в условиях гипоксии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Курсовое внутрибрюшинное введение лабораторным животным пчелиного яда в дозе 0,1 мг/кг, вызывающее развитие неспецифической адаптационной реакции устойчивой активации непосредственно после окончания введения препарата, сопровождается снижением интенсивности перекисного окисления липидов и увеличением антиоксидантного статуса организма. Предположительно, введение зоотоксинов вызывает активацию симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизо-надпочечниковой систем, и, как

следствие, продукцию активных форм кислорода, которые с большой долей вероятности индуцируют мощную антиоксидантную систему защиты. Наблюдаемое повышение активности сукцинатдегидрогеназы указывало на стимуляцию биоэнергетических процессов.

При моделировании барометрической гипоксии у контрольных животных происходило развитие стресса, о чем свидетельствовали показатели лейкоцитарной формулы. В опытных группах, которым предварительно вводили раствор пчелиного яда, развития стресс-реакции после барометрической гипоксии в организме не наблюдалось. По всей видимости, это связано с реализацией стресс-лимитирующих систем, индуцируемых предварительным введением яда. Таким образом, реакция устойчивой активации, формирующаяся при курсовом внутрибрюшинном введении пчелиного яда, характеризуется возникновением устойчивости лабораторных животных к гипоксии.

При пероральном введении нанокompозитов, содержащих зоотоксины пчелы, возникновение реакции устойчивой активации наблюдалось через неделю после окончания применения препаратов. Можно полагать, что это обусловлено неполным всасыванием нанокompозитов, а также длительной диссоциацией компонентов яда от ядра всосавшихся наночастиц в крови. Реакция активации, вызванная пероральным введением нанокompозитов, как и при внутрибрюшинном введении яда, сопровождается индукцией антиоксидантной системы.

Реакция активации, развивающаяся через неделю после окончания перорального введения нанокompозитов, содержащих пчелиный яд, характеризуется резистентностью к гипоксии, на что указывали индикаторные показатели системы крови. Это, видимо, связано с повышением антиоксидантного статуса организма и коррекцией энергетического обмена.

Полученные результаты указывают на перспективность использования нанокompозитов, содержащих пчелиный яд, в качестве адаптогена к экологически неблагоприятным условиям, в частности, гипоксии.

## **ВЫВОДЫ**

1. Развитие неспецифической адаптационной реакции устойчивой активации, вызванное курсовым внутрибрюшинным введением пчелиного яда (0,1 мг/кг) крысам, характеризуется статистически значимым повышением содержания эритроцитов, снижением светосуммы S биохемиллюминесценции, уменьшением содержания продуктов липопероксидации (диеновых, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа), увеличением активности СОД и СДГ.

2. Адаптационная реакция устойчивой активации, индуцированная курсовым внутрибрюшинным введением пчелиного яда (0,1 мг/кг) сопровождается формированием устойчивости лабораторных животных к гипобарической гипоксии спустя сутки после окончания инъекций, о чем свидетельствуют:

а) соответствие количества и соотношения форменных элементов крови условиям нормы;

б) снижение интенсивности свободнорадикальных процессов и нормализация активности ферментов энергетического обмена.

3. Курсовое пероральное введение наноконпозитов, содержащих пчелиный яд (0,5 мг/кг и 1 мг/кг), экспериментальным животным вызывает возникновение адаптационной реакции устойчивой активации через неделю после окончания введения препаратов.

4. Реакция устойчивой активации, стимулированная пероральным введением наноконпозитов, содержащих пчелиный яд, приводит к повышению устойчивости крыс к гипоксии, на что указывает:

а) соответствие индикаторных показателей системы крови опытных животных параметрам нормы,

б) снижение интенсивности свободнорадикальных процессов, активация антиоксидантной системы, уменьшение активности лактатдегидрогеназы плазмы крови.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Александрова, О.И. (Коновалова, О.И.) Влияние пчелиного яда на энергетический обмен, перекисное окисление липидов и систему крови в условиях кратковременной барометрической гипоксии / **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)**, Е.А. Ерофеева, А.С. Корягин, В.В. Логинов // Естествознание и гуманизм. Сб. науч. трудов. - 2006. - Т. 3. - № 3. - С. 73.

2. Александрова, О.И. (Коновалова, О.И.) Влияние пчелиного яда на интенсивность перекисного окисления липидов и энергетический обмен у крыс при многократном введении в условиях относительной нормы / **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)**, Е.А. Ерофеева, А.С. Корягин, О.Н. Гамова // Естествознание и гуманизм. Сб. науч. трудов. - 2006. - Т. 3. - № 4. - С. 36.

3. Корягин, А.С. Адаптогенные свойства пчелиного яда при действии экстремальных факторов различной природы / А.С. Корягин, Е.А.Ерофеева, **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)** // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. - 2007. - №3. - С. 113-115.

4. Александрова, О.И. (Коновалова, О.И.) Сравнительный анализ адаптогенных свойств некоторых зоотоксинов в условиях кратковременной барометрической гипоксии / **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)** // Вятский медицинский вестник. Мат-лы Всероссийской научно-практ. конференции «Актуальные вопросы современной биохимии», посв. 20-летию Кировской государственной медицинской академии. – 2007. - №4. – С. 81-83.

5. Александрова, О.И. (Коновалова, О.И.) Адаптогенные свойства пчелиного яда в условиях кратковременной барометрической гипоксии / **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)**, Е.А. Ерофеева, М.Н. Таламанова, О.Н. Гамова // Мат-лы докл. XIV Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных «ЛОМОНОСОВ». [Электронный ресурс] - 2007.

6. Александрова, О.И. (Коновалова, О.И.) Анализ антигипоксических свойств ядов пчелы и жабы в условиях кратковременной гипобарической гипоксии / **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)**, Е.А. Ерофеева // Тез. докл. V Всероссийской конф. с межд. участием, посв. 100-летию со дня рожд. В.Н. Черниговского. - 2007. - С. 27-28.

7. Александрова, О.И. Исследование типа неспецифического адаптационного ответа и антиоксидантно-прооксидантного статуса организма при пероральном введении пчелиного яда в составе наноконпозитов / **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)** // XIII Нижегородская сессия молодых ученых. Естественно-научные дисциплины. – 2008. – С. 7.

8. Корягин, А.С. Исследование неспецифического адаптационного ответа и антиоксидантно-прооксидантного статуса организма при пероральном введении наноконпозитов, содержащих пчелиный яд / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.И. Александрова (О.И. Коновалова)** // Биология: Теория, практика, эксперимент: мат-лы Междунар. науч. конф., посв. 100-летию со дня рожд. д.б.н., проф. Сапожниковой Е.В. Кн.2. - 2008. - С. 180-182.