

На правах рукописи

ТАЛАМАНОВА Мария Николаевна

**АДАПТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ
НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА
ПЧЕЛИНОГО ЯДА ПРИ ГАММА-ОБЛУЧЕНИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2010

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Корягин Александр Сергеевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Моничев Александр Яковлевич

доктор биологических наук
Ягин Валерий Васильевич

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Росздрава»

Защита состоится «___» _____ 2010 г. в «___» часов на заседании Диссертационного совета Д 212.166.12 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ

Автореферат разослан «___» _____ 2010 года

Ученый секретарь диссертационного совета:
кандидат биологических наук,
доцент

Копылова С.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Неблагоприятная экологическая обстановка, высокий уровень загрязнения окружающей среды, масштабное строительство новых АЭС, частые и длительные стрессы (психоземotionalные перегрузки) неблагоприятно влияют на функциональное состояние человека, провоцируя развитие вторичных патологических дефицитных состояний. В этом свете актуальной является разработка новых эффективных адаптогенов с полифункциональными свойствами, обеспечивающих резистентность организма к действию различных неблагоприятных факторов. Перспективным в этом направлении представляется создание биопрепаратов на основе природных биологически активных полимеров, в частности хитозана и зоотоксинов.

Высокая биологическая активность, а также способность вызывать общие неспецифические ответные реакции, позволяет рассматривать зоотоксины, как возможные стимуляторы радиорезистентности. Показано, что зоотоксины пчелы при курсовом внутрибрюшинном введении в малых дозах повышают резистентность организма к гипоксии, ионизирующему облучению, обусловленную развитием неспецифической адаптационной реакции устойчивой активации (Корягин, 2007, Крылов и др., 2008). Необходимо отметить, что из-за высокой антигенной и аллергенной активности яда его парентеральное применение ограничено в практической медицине, а введение зоотоксина *per os* не оказывает желаемого эффекта как из-за белковой природы его компонентов, а также и возможного их повреждающего действия на слизистую желудочно-кишечного тракта (Matzke, Bogdanov, 2001).

Современные достижения в области нанотехнологий позволяют создавать наноструктурированные биопрепараты способные, при пероральном введении в организм, не только преодолевать эпителиальный барьер кишечника и попадать в кровь (Муццарелли, 2001), но и способствовать защите белковой структуры фармакологического агента. Это является важным пусковым аспектом при создании и использовании препаратов на основе пчелиного яда в практической медицине. Необходимо отметить, что имеются единичные исследовательские работы по выявлению действия на организм животного пчелиного яда в составе меда при пероральном введении (Ошевенский и др., 2005). Исследования свойств пчелиного яда в составе наночастиц как стимулятора ра-

диорезистентности при пероральном введении экспериментальным животным не проводилось.

Система крови и кроветворения является интегративной системой, наиболее полно отражающей состояние и характер метаболизма целого организма. Именно элементы данной структуры страдают в первую очередь при действии ионизирующего излучения, а ее показатели отражают состояние физиологических систем и используются в качестве критериев адаптационных реакций организма (Васильев и др., 1992).

В связи с вышесказанным в работе именно показатели системы крови были выбраны в качестве критериев оценки противолучевых эффектов пчелиного яда в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото».

Цель исследования:

Изучить адаптогенное действие яда пчелы медоносной (*Apis mellifera* L.) в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» к повреждающему действию радиации при курсовом пероральном применении до и после однократного γ -облучения лабораторных животных в дозах 3,0 и 5,0 Гр, оцениваемое по показателям системы крови.

Задачи исследования:

1. Определить тип адаптационной реакции и изучить ее формирование у экспериментальных животных по показателям системы крови и свободнорадикального окисления при курсовом пероральном введении пчелиного яда в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» в условиях относительной нормы.

2. Изучить радиопротекторную эффективность яда пчелы в составе наносистем «хитозан-золото» при профилактическом курсовом пероральном применении перед однократным γ -облучением лабораторных животных в дозах 3,0 и 5,0 Гр, оцениваемую по показателям периферической крови, красного костного мозга и активности свободнорадикальных процессов.

3. Оценить адаптогенные свойства пчелиного яда в составе наносистем «хитозан-золото» на систему крови при курсовом пероральном применении после однократного γ -облучения экспериментальных животных в дозах 3,0 и 5,0 Гр.

Научная новизна исследования

В работе впервые, по показателям системы крови, определен тип адаптационной реакции организма при курсовом пероральном введении

пчелиного яда лабораторным животным в составе наносистем «хитозан-золото».

Впервые показано, что пчелиный яд в составе наносистем «хитозан-золото» при курсовом введении рег ос стимулирует радиорезистентность экспериментальных животных при повреждающем действии γ -облучения в дозах 3,0 и 5,0 Гр.

Установлено, что адаптогенное действие яда пчелы в составе наносистем «хитозан-золото» на фоне предварительного действия ионизирующей радиации, вызывающего костномозговую форму лучевой болезни, связано с переводом организма экспериментальных животных из состояния стресса в состояние устойчивой активации.

Практическая и теоретическая значимость работы

Исследования адаптогенной эффективности малых доз яда пчелы в составе наноструктурированных препаратов при курсовом пероральном введении, их способности повышать радиорезистентность системы крови при однократном γ -облучении в дозах вызывающих костномозговую форму лучевой болезни позволяют расширить представления о механизмах формирования неспецифической радиорезистентности и предполагают возможность создания с помощью нанотехнологий биопрепаратов для перорального применения, повышающих радиорезистентность организма.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Курсовое пероральное введение пчелиного яда экспериментальным животным в составе наносистем «хитозан-золото» вызывает формирование неспецифической адаптационной реакции устойчивой активации спустя неделю после окончания введения препарата.
2. Формирование адаптационной реакции устойчивой активации у лабораторных животных, вызванное профилактическим курсовым введением малых доз пчелиного яда в составе нанокомпозитов, сопровождается возникновением состояния радиорезистентности.
3. Многократное введение яда пчелы в составе наноструктурированного препарата экспериментальным животным после однократного γ -облучения оказывает положительный адаптогенный эффект, облегчая протекание острой костномозговой формы лучевой болезни легкой и средней степени тяжести объясняемый переводом организма животного из состояния стресса в состояние устойчивой активации.

Апробация работы

Результаты работы были доложены и обсуждены на XV, XVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых

ученых «Ломоносов» (Москва, 2008, 2009); I, II Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов – биологов «Симбиоз-Россия» (Казань, 2008 – **диплом 1 степени**; Пермь, 2009 – **диплом за лучший стендовый доклад**); I Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, 2009); 9th International Conference of the European Chitin Society «EUCSI 2009» (Venice, Italy, 2009); XIII Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2008); 13th annual Symposium for Biology Students of Europe (Kazan, Russia, 2009).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа в объеме 137 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературы. Библиографический указатель включает 122 источника литературы (105 отечественной и 17 зарубежной). Диссертация иллюстрирована 52 таблицами и 16 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа была проведена на 117 белых нелинейных крысах-самцах массой 200–250 г, содержащихся в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещенности. В опытах использовали яд пчелы медоносной (*Apis mellifera* L.) $DL_{50} = 8-10$ мг/кг. Наноструктурированный препарат «наночастицы золота - пчелиный яд - хитозан» получали на кафедре высокомолекулярной и коллоидной химии химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского методом УФ-индуцированного восстановления золотохлористоводородной кислоты. Средний размер наночастиц золота в биопрепарате составлял 5-10 нм (Смирнова и др., 2005). Препараты вводили через рот с помощью зонда в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки объемом 1 мл на животное, что соответствовало дозам наночастицы золота – 0,5 мг/кг, пчелиный яд – 0,5 мг/кг и 1,0 мг/кг, хитозан – 100 мг/кг массы животного. Контрольным животным вводили раствор наносистем «хитозан-золото» в тех же дозах и объеме.

Выбор доз, вызывающих развитие адаптационной реакции устойчивой активации, обусловлен соответствующими данными литературы (Корягин, Ерофеева, 2004; Ошевенский и др., 2005).

Было проведено 5 серий экспериментов в опытах *in vivo*. Общее распределение животных по сериям представлено в таблице.

Таблица

Общее количество экспериментальных животных и их распределение по сериям

Серии исследований	Доза γ -облучения, Гр	Количество животных
Определение типа адаптационной реакции организма при курсовом пероральном введении малых доз пчелиного яда в водном растворе и в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» в условиях относительной нормы по показателям крови и процессам СРО в плазме крови	-	32
Изучение радиозащитного действия пчелиного яда в составе наносистем «хитозан-золото» при курсовом пероральном введении перед однократным γ -облучением	5	25
	3	20
Изучение адаптогенных свойств малых доз пчелиного яда в составе наносистем «хитозан-золото» при его курсовом пероральном применении после γ -облучения	5	25
	3	15

В первой серии экспериментов, для определения типа адаптационной реакции организма лабораторных животных при курсовом пероральном введении малых доз пчелиного яда в водном растворе и в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» в условиях относительной нормы. На 1, 7 и 14 сутки после окончания введения препаратов в крови определяли количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, количество эритроцитов и концентрацию гемоглобина, значение лейкоцитарного коэффициента (процентное отношение процента лимфоцитов к проценту сегментоядерных нейтрофилов). Согласно Гаркави Л.Х (2003) лейкоцитарный коэффициент является одним из сигнальных показателей при определении типа неспецифической адаптационной реакции. Его значение снижается при стрессе и увеличивается при устойчивой активации. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления (СРО) и активность антиоксидантной системы в плазме крови оценивали используя метод Fe^{2+} индуцированной биохемилуминесценции. Кровь для анализа забирали из подъязычной вены животного.

Задачей второй и третьей серии экспериментов было исследование радиозащитного действия пчелиного яда в составе наносистем «хито-

зан-золото» при курсовом пероральном введении перед однократным γ -облучением. Яд пчелы в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг в составе наносистем вводили перед облучением в течение 7 дней. Через неделю после окончания введения биопрепаратов животные подвергались общему однократному γ -облучению на терапевтической установке АГАТ-С (Co^{60}) на базе Нижегородского городского онкологического диспансера. Во второй серии экспериментов доза облучения составляла 5Гр, в третьей — 3Гр. Мощность облучения — 1 Гр/мин. Дозы однократного облучения 3Гр и 5Гр вызывают у крыс развитие костномозговой формы лучевой болезни легкой и средней степени тяжести соответственно (Ярмоненко, Вайнсон, 2007). Изменение состояния основных показателей крови (количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, значение лейкоцитарного коэффициента, количество эритроцитов и концентрация гемоглобина) и процессов СРО определяли на 1, 14 и 28 сутки после облучения. На 28 сутки вели подсчет количества клеток костного мозга в бедренной кости экспериментальных животных.

Четвертая и пятая серии экспериментов были посвящены изучению адаптогенных свойств малых доз пчелиного яда в составе наносистем «хитозан-золото» при его курсовом пероральном применении после γ -облучения. Животные подвергались общему однократному γ -облучению в дозах 5Гр — четвертая серия и 3Гр — пятая серия экспериментов. Мощность облучения — 1 Гр/мин. «Терапию» проводили в течение 7 суток, начиная лечение через 2 часа после облучения.

Кровь для анализа забирали из подъязычной вены на 1, 14 и 28 сутки после окончания «терапии», что соответствовало 8, 21 и 35 суткам после облучения. Выбор этапов забора крови был обусловлен тем, что эти периоды характеризуются типичными для системы крови реакциями на курсовое введение адаптогенов (Горизонтов и др., 1983; Гаркави и др., 2003). В крови определяли количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, лейкоцитарный коэффициент и интенсивность процессов СРО. На 28 сутки осуществляли подсчет количества клеток красного мозга в бедренной кости животных.

Количество лейкоцитов определяли с помощью камеры Горяева (Ронин, Старобинец, 1989); *подсчет лейкоцитарной формулы* — с окраской мазков по Романовскому-Гимзе (Козинец, Макаров, 1998); *количество клеток костного мозга* в бедренной кости — методом П.Д. Горизонтова (Горизонтов и др., 1983); *подсчет числа эритроцитов* — фотоэлектроколориметрическим методом (Меньшиков и др., 1987); *концен-*

трацию гемоглобина – гемиглобинцианидным методом (Меньшиков и др., 1987).

Интенсивность свободнорадикального окисления определяли методом Fe^{2+} индуцированной биокемиллюминесценции (Кузьмина и др., 1983).

Результаты исследований статистически обрабатывали с помощью пакета программ BIOSTAT и Statistica v.6.0. Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. При расчете t-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони, позволяющую устранить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом (Гланц, 1999; Реброва, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение типа адаптационной реакции организма при курсовом пероральном введении малых доз пчелиного яда в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» в условиях относительной нормы

Задачей данной серии эксперимента явилось определение типа неспецифической адаптационной реакции организма лабораторных животных при курсовом пероральном введении малых доз пчелиного яда в составе наносистем в условиях относительной нормы. Для ее решения был проведён анализ показателей системы крови и индуцированной биокемиллюминесценции плазмы крови. Проведено исследование действия двух доз пчелиного яда в составе наносистем: 0,5 мг/кг и 1,0 мг/кг.

Анализ параметров крови (количества лейкоцитов, лейкоцитарная формула) и интенсивность свободнорадикального окисления выявил, что через сутки после окончания курсового перорального введения наносистем происходит формирование адаптационной реакции активации. Развитие стойкой активации не наблюдалось, так как заметных изменений маркерных показателей (количества лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов) развития адаптации не происходило. Поэтому для выявления сроков полного формирования адаптационной реакции увеличили временной интервал и проводили исследование тех же показателей через неделю после окончания введения наносистем, содержащих пчелиный яд.

Изучение показателей белой крови через 7 суток после окончания курсового перорального введения препарата позволило выявить, что количество лейкоцитов в исследуемых группах сохранялось на одном уровне с интактными животными (табл. 1). В контрольной группе на-

блюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов на 21% относительно интактных животных. Лейкоцитарный коэффициент в контрольной группе относительно интактных не изменялся.

Таблица 1

Количество лейкоцитов и значение индикаторных показателей лейкоцитарной формулы крови крыс на 7 сутки после курсового перорального введения пчелиного яда в составе наносистем «хитозан-золото»

Показатель	Интактные	Контроль (хитозан + золото)	Опыт I (хитозан + золото + яд пчелы 0,5 мг/кг)	Опыт II (хитозан + золото + яд пчелы 1,0 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$14,7 \pm 1,17$	$15,4 \pm 0,38$	$10,5 \pm 0,15$ * #	$11,3 \pm 0,38$ * #
Сегментоядерные нейтрофилы, %	$19,1 \pm 1,07$	$22,2 \pm 1,50$	$13,6 \pm 0,38$ * #	$17,3 \pm 1,60$
Лимфоциты, %	$74,7 \pm 0,30$	$74,1 \pm 1,65$	$82,6 \pm 0,74$ * #	$79,8 \pm 2,0$
Лейкоцитарный коэффициент, усл.ед.	$4,0 \pm 0,17$	$3,4 \pm 0,32$	$6,1 \pm 0,23$ * #	$4,9 \pm 0,66$

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

В опытной группе, которой перорально вводили пчелиный яд в дозе 0,5 мг/кг в составе наносистем количество лимфоцитов статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивалось на 10,5%, а количество сегментоядерных нейтрофилов уменьшалось ($p < 0,05$) на 26% относительно интактных животных. Лейкоцитарный коэффициент статистически значимо повышался в данной опытной группе на 49% относительно показателя интактных животных ($p < 0,05$). Во второй опытной группе количество сегментоядерных нейтрофилов оставалось на уровне интактных, также наблюдалась тенденция к увеличению количества лимфоцитов и лейкоцитарного коэффициента относительно этой группы животных. Таким образом, в опытных группах развивается реакция активация, причем в опытной группе с дозой пчелиного яда 0,5 мг/кг в составе наносистем адаптационная реакция более выражена.

Через 7 суток после окончания курсового перорального введения препарата в контрольной группе не наблюдалось статистически значимых изменений показателей свободнорадикального окисления относительно интактных. Однако в опытных группах отмечалось статистиче-

ски значимое снижение активности свободнорадикального окисления. Показатель светосуммы S биохемилюминесценции отражающий способность компонентов системы подвергаться процессам окисления, снижался в опытных группах относительно интактных в равной степени на 14% (рис. 1).

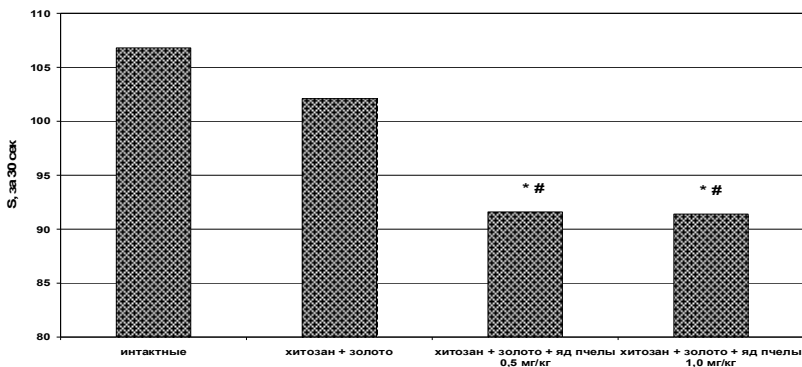


Рис. 1. Светосумма S плазмы крови крыс через 7 суток после окончания курсового перорального введения препаратов

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

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

Изучение радиопротекторного действия профилактического курсового перорального введения пчелиного яда в составе наносистем при общем однократном гамма-облучении

Для исследования радиозащитного действия курсового перорального введения пчелиного яда в составе наносистем «хитозан-золото» при однократном гамма-облучении были выбраны дозы 3 и 5 Гр, вызывающие костномозговую форму лучевой болезни легкой и средней степени тяжести для крыс (соответственно).

На следующие сутки после однократного гамма-облучения в дозе 5Гр в группах «контроль на облучение» и контроль (хитозан+золото) наблюдалось резкое снижение количества лейкоцитов периферической крови на 80% и 68% соответственно.

В опытных группах, которым вводили пчелиный яд в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг в составе наносистем, наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) повышение количества выживших лейкоцитов относительно группы «контроль на облучение» в 3,4 и 2,9 раза соответственно. Количество лимфоцитов в опытных группах снижалось на 64,6% и 72,4% относительно интактных животных, при этом эти значения выше, чем в контрольной группе (хитозан+золото) животных на 90,1% и 45,9% соответственно ($p < 0,05$). Количество сегментоядерных нейтрофилов в обеих опытных группах было статистически значимо выше интактных животных в 2,6 и 2,8 соответственно и находилось на одном уровне со значениями контрольных животных. Тем самым показано, что γ -облучение животных контрольных и опытных групп в дозе 5Гр сопровождается развитием стресс-реакции, для которой характерно увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов и уменьшением количества лимфоцитов в лейкограмме.

На 14 сутки после однократного γ -облучения в дозе 5Гр количество лейкоцитов в контрольных группах по-прежнему было ниже уровня лейкоцитов интактных животных и осталось практически неизменным по отношению к количеству лейкоцитов у контрольных групп на 1 сутки после гамма-облучения. Это может косвенно говорить о нарушении в системе кроветворения связанное, по всей видимости, с опустошением красного костного мозга. Количество лейкоцитов в опытных группах, которым предварительно вводили пчелиный яд дозой 0,5 и 1,0 мг/кг в составе нанокомпозиций достигло уровня интактных животных и было статистически значимо выше ($p < 0,05$) уровня лейкоцитов в контрольных группах в 2 раза (табл. 2).

Анализируя лейкоцитарную формулу через две недели после облучения, установлено, что во всех экспериментальных группах количество лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов достигло уровня интактных животных, что свидетельствует о выходе животных из состояния стресса и возможном восстановлении показателей системы крови.

При оценке интенсивности свободнорадикальных процессов по показателям биохемилуминесценции в условиях однократного облучения в группе «контроль на облучение» происходит резкое снижение светосуммы S индуцированной хемилуминесценции относительно показате-

ля интактных животных. Понижение активности свободнорадикальных процессов в крови облученных животных может быть связано с меньшим количеством лейкоцитов и снижением их функциональной активности. Показатель светосуммы S в опытных группах, которым перорально вводили пчелиный яд в дозе 0,5 и 1,0 мг/кг в составе наносистем, находятся на уровне интактных животных и животных группы «хитозан+золото» и были статистически значимо выше ($p < 0,05$) показателей группы «контроль на облучение» (рис. 2).

Таблица 2

Количество лейкоцитов в крови крыс на 14 сутки после однократного гамма-облучения в дозе 5 Гр при профилактическом пероральном введении яда пчелы в составе наносистем

Показатель	Интактные	Контроль на облучение	Контроль (хитозан + Au)	Опыт I (хитозан + Au + яд пчелы 0,5 мг/кг)	Опыт II (хитозан + Au + яд пчелы 1,0 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$14,5 \pm 1,20$	$4,8 \pm 0,05^*$	$5,7 \pm 0,90^*$	$13,0 \pm 1,10 \#+$	$11,0 \pm 1,16 \#+$
Сегментоядерные нейтрофилы, %	$27,0 \pm 1,44$	$23,4 \pm 2,38$	$17,8 \pm 2,34$	$21,8 \pm 1,85$	$23,8 \pm 2,72$
Лимфоциты, %	$64,4 \pm 2,30$	$66,7 \pm 3,65$	$68,8 \pm 4,84$	$63,5 \pm 3,14$	$68,5 \pm 3,06$

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным, # - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль на облучение», + - $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

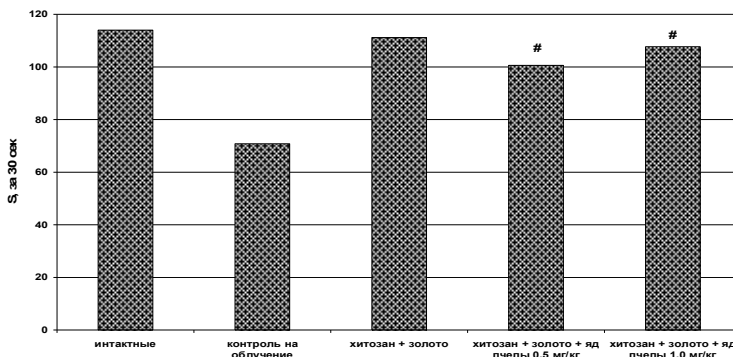


Рис. 2. Светосумма S (за 30 сек) биохемилуминесценции плазмы крови крыс через 14 суток однократного гамма-облучения в дозе 5 Гр при профилактическом пероральном введении яда пчелы в составе наносистем

Примечание: # - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль на облучение»

При определении количества эритроцитов в крови облученных животных показано, что достоверных отличий между группами обнаружено не было, что может быть связано с высокой продолжительностью жизни и с устойчивостью самих эритроцитов, как безъядерных клеток, к действию радиации.

На 28 сутки после однократного гамма-облучения в дозе 5Гр у контрольных групп животных наблюдается увеличение количества лейкоцитов на 101% в группе «контроль на облучение» и на 75% в контрольной группе «хитозан+золото» по отношению к интактным, что указывает на возможное протекание инфекционных и воспалительных процессов в данных группах (рис.3). Количество лейкоцитов в опытных группах на 28 сутки после однократного облучения экспериментальных животных не отличалось от уровня интактных животных и было статистически значимо ниже ($p < 0,05$) показателей контрольных животных.

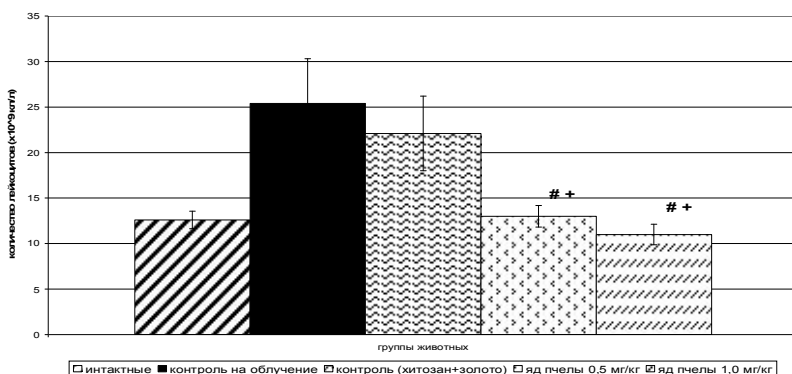


Рис. 3. Количество лейкоцитов в крови на 28 сутки после однократном облучении в дозе 5 Гр при профилактическом пероральном введении нанокмппозитов

Примечание: *- $p < 0,05$ по отношению к интактным животным, # - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль на облучение», + - $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

Только по показателям периферической крови и показателям индуцированной биохимиллюминесценции выявить, с большей долей вероятности, радиозащитный эффект пчелиного яда в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» при предварительном введении в условиях моделирования лучевой болезни средней степени тяже-

сти достаточно сложно. Система кроветворения является наиболее радиочувствительной, поэтому нами был осуществлен подсчет количества клеток костного мозга в бедренной кости крыс. В опытных группах животных, которым вводили пчелиный яд в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг, содержание клеток красного костного мозга было статистически значимо ниже ($p < 0,05$) по отношению к уровню животных контрольной группы «хитозан+золото» (табл. 3).

Таблица 3

Количество кроветворных клеток костного мозга ($\times 10^6$ кл; в бедренной кости) после однократного гамма-облучения в дозе 5 Гр при профилактическом курсовом пероральном введении нанокompозитов

Группы животных	28 сутки
Интактные	$16,1 \pm 1,21$
Контроль на облучение	$16,4 \pm 1,09$
Контроль (хитозан+золото)	$17,7 \pm 0,22$
Опыт I (хитозан + золото + яд пчелы 0,5 мг/кг)	$13,1 \pm 0,60 +$
Опыт II (хитозан + золото + яд пчелы 1,0 мг/кг)	$13,5 \pm 0,63 +$

Примечание: + - $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

Снижение количества клеток костного мозга в опытных группах свидетельствует о более низкой скорости пролиферативных процессов кроветворных клеток. В предыдущих исследованиях, проведенных на кафедре физиологии и биохимии человека и животных ННГУ (Гамова, 2007), показано, что курсовое внутрибрюшинное введение яда пчелы приводит к уменьшению скорости деления кроветворных клеток. У облученного организма это способствует увеличению времени процессов репарации (антимутагенный эффект пчелиного яда).

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о возникновении адаптационного эффекта пчелиного яда при его профилактическом пероральном введении в составе наносистем, на что указывает сокращение времени процессов восстановления костного мозга, восстановление показателей периферической крови и показателей биофлуоресценции. Это, по всей видимости, связано с тем, что опытные группы перед облучением находились в состоянии антистрессорной реакции устойчивой активации, которая характеризуется подъемом защитных систем организма, в частности антиоксидантной системы, и формированием резистентности к действию повреждающих факторов различной природы, в нашем случае ионизирующей радиация. Показан-

ное адаптогенное действие биопрепаратов при пероральном введении указывает на то, что пчелиный яд в составе наносистем «хитозан-золото» с большей долей вероятности способен проникать через эпителий желудочно-кишечного тракта и проявлять свою биологическую активность.

Радиозащитный эффект пчелиного яда в составе наноструктурированного препарата «хитозан-золото» был также выявлен и при развитии костномозговой формы лучевой болезни легкой степени тяжести (3 Гр).

Изучение адаптогенных свойств малых доз пчелиного яда в составе наносистем при его курсовом пероральном применении в условиях предварительного гамма-облучения животных

Экстренная противолучевая терапевтическая помощь – наименее освоенная область радиационной биологии и медицины. С учетом того, что слабые раздражители могут вызывать благоприятные для организма реакции на фоне течения болезни, переводя его из стрессового состояния в другую более оптимальную неспецифическую реакцию (тренировка, активация) (Гаркави и др., 2003), исследование адаптогенных свойств малых доз зоотоксинов на фоне предварительного облучения является весьма перспективным.

Для исследования адаптогенных свойств пчелиного яда в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» была выбрана модель радиационного облучения организма животного в дозах, вызывающих костномозговую форму лучевой болезни легкой и средней степени тяжести (3 и 5Гр).

На 1 сутки после окончания курсового перорального введения пчелиного яда в составе наноструктурированного биопрепарата предварительно облученным животным в дозе 5Гр количество выживших лейкоцитов во всех группах было сниженным на 72 – 84% по отношению к интактным (табл. 4).

На фоне однократного облучения в дозе 5Гр у животных группы «контроль на облучение» количество лимфоцитов снижалось на 84% и более чем на 70% у контрольной группы «хитозан+золото» по отношению к интактным животным. Количество сегментоядерных нейтрофилов в контрольных группах увеличилось в 3 раза по сравнению с интактными животными.

После окончания «терапевтического» введения наноструктурированных биопрепаратов в опытных группах, содержащих яд пчелы в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) пони-

жение количества лимфоцитов в 2 раза по отношению к интактным животным, но повышение ($p < 0,05$) по отношению к группе «контроль на облучение». Уровень сегментоядерных нейтрофилов был статистически значимо ($p < 0,05$) выше уровня интактных, но достоверно ($p < 0,05$) ниже значений животных контрольных групп.

Таблица 4

Количество лейкоцитов в крови крыс на 1 сутки после курсового перорального введения яда пчелы в составе нанокмппозитов в условиях предварительного гамма-облучения в дозе 5 Гр

Показатель	Интактные	Контроль на облучение	Контроль (хитозан + Au)	Опыт I (хитозан + Au + яд пчелы 0,5 мг/кг)	Опыт II (хитозан + Au + яд пчелы 1,0 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	14,1 \pm 1,80	2,3 \pm 0,21	4,0 \pm 0,39	2,4 \pm 0,20 *	3,3 \pm 0,21 *
Сегментоядерные нейтрофилы, %	15,9 \pm 1,90	49,5 \pm 2,00	42,9 \pm 2,30	35,6 \pm 1,37 *#+	39,6 \pm 2,26 *#
Лимфоциты, %	77,6 \pm 1,66	33,4 \pm 2,70	39,9 \pm 3,60	48,7 \pm 1,05 *#+	49,8 \pm 2,90 *#

Примечание: *- $p < 0,05$ по отношению к интактным животным, # - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль на облучение», + - $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

На 14 сутки количество лейкоцитов в контрольных и опытных группах возросло по сравнению с показателями полученными на 1 сутки, но были статистически значимо ($p < 0,05$) ниже интактных животных (табл. 5). Количество сегментоядерных нейтрофилов во всех группах было ниже относительно уровня нейтрофилов на 1 сутки. В опытной группе I, которой вводили яд пчелы в дозе 0,5 мг/кг количество сегментоядерных нейтрофилов было статистически значимо ($p < 0,05$) выше уровня интактных животных, но ниже уровня контрольных животных. В группе животных, которым вводили пчелиный яд в дозе 1,0 мг/кг количество сегментоядерных нейтрофилов также было статистически значимо ($p < 0,05$) выше уровня интактных животных, но выше значений контрольных групп.

Количество лимфоцитов в лейкограмме на 14 сутки в опытной группе I было статистически значимо ($p < 0,05$) ниже значения интактных, но достоверно ($p < 0,05$) выше уровня контрольных животных. Уровень лимфоцитов во второй опытной группе был статистически значимо ($p < 0,05$) ниже уровня интактных и контрольных животных.

Лейкоцитарный коэффициент в опытной группе, животным которой перорально вводили пчелиный яд дозой 0,5 мг/кг в составе наносистем «хитозан-золото» был статистически значимо ($p < 0,05$) ниже интактных, но наблюдается тенденция к увеличению данного показателя относительно контрольных групп, что свидетельствует о начале выхода организма животных из состояния стресса, связанное с активацией восстановительных процессов в данной группе. Необходимо отметить, что во второй опытной группе значение лейкоцитарного коэффициента было ниже чем у интактных животных ($p < 0,05$), контрольных и первой опытной групп, так как животные данной группы находились в состоянии стресса. По-видимому, на фоне радиационного стресса более высокая доза яда отягощает состояние организма.

Таблица 5

Количество лейкоцитов и значение индикаторных показателей системы крови крыс на 14 сутки после курсового перорального введения яда пчелы в составе нанокомпозитов в условиях предварительного гамма-облучения в дозе 5 Гр

Показатель	Интактные	Контроль на облучение	Контроль (хитозан + Au)	Опыт I (хитозан + Au + яд пчелы 0,5 мг/кг)	Опыт II (хитозан + Au + яд пчелы 1,0 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$13,7 \pm 1,36$	$7,2 \pm 1,02$	$8,3 \pm 0,70$	$7,3 \pm 0,60^*$	$8,1 \pm 1,20^*$
Сегментоядерные нейтрофилы, %	$14,2 \pm 1,10$	$29,1 \pm 1,26$	$27,4 \pm 2,47$	$22,6 \pm 2,70^*$	$34,2 \pm 1,88^*$
Лимфоциты, %	$78,9 \pm 1,13$	$59,1 \pm 1,80$	$58,1 \pm 1,10$	$68,4 \pm 1,80^* \# +$	$48,4 \pm 1,88^* \# +$
Лейкоцитарный коэффициент, усл.ед	$5,7 \pm 0,55$	$2,0 \pm 0,15$	$2,2 \pm 0,19$	$3,1 \pm 0,39^*$	$1,4 \pm 0,12^*$

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным, # - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль на облучение», + - $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

На 28 сутки количество лейкоцитов во всех группах достигло уровня интактных животных (табл.6). Количество лимфоцитов у животных опытной группы, которым перорально вводили яд пчелы дозой 0,5 мг/кг, не отличалось от уровня интактных и контрольных животных. Количество сегментоядерных нейтрофилов в данной опытной группе было статистически значимо ($p < 0,05$) снижено по отношению к группе «хитозан+золото», но достоверного снижения относительно интактной группы и группы «контроль на облучение» не отмечалось.

Уровень лимфоцитов у животных опытной группы, которым перорально вводили яд пчелы в дозе 1,0 мг/кг был статистически значимо ($p < 0,05$) ниже интактных и группы «контроль на облучение». Количество сегментоядерных нейтрофилов было статистически значимо ($p < 0,05$) выше значений интактных животных.

Таблица 6

Количество лейкоцитов и значение индикаторных показателей крови крыс на 28 сутки после курсового перорального введения яда пчелы в составе нанокompозитов в условиях предварительного гамма-облучения в дозе 5 Гр

Показатель	Интактные	Контроль на облучение	Контроль (хитозан + Au)	Опыт I (хитозан + Au + яд пчелы 0,5 мг/кг)	Опыт II (хитозан + Au + яд пчелы 1,0 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	10,2 ± 0,80	9,0 ± 1,15	9,0 ± 0,19	9,1 ± 0,80	10,5 ± 0,70
Сегментоядерные нейтрофилы, %	18,0 ± 2,60	18,6 ± 1,43	24,1 ± 1,27	14,0 ± 1,30+	27,5 ± 2,20 *
Лимфоциты, %	70,3 ± 3,00	68,4 ± 0,96	61,5 ± 0,96	66,7 ± 2,90	57,7 ± 2,50*#
Лейкоцитарный коэффициент, усл.ед	4,0 ± 0,90	3,7 ± 0,30	2,6 ± 0,17	5,3 ± 0,60 +	2,2 ± 0,30*

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным, # - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль на облучение», + - $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

Значение лейкоцитарного коэффициента в контрольных группах на протяжении всех 28 дней было ниже уровня данного показателя у интактных животных. В опытной группе животных, которым перорально вводили пчелиный яд дозой 0,5 мг/кг в составе наносистем «хитозан-золото» к 28 суткам лейкоцитарный коэффициент статистически значимо ($p < 0,05$) увеличился относительно контрольной группы «хитозан+золото» и достиг значений интактных животных, что свидетельствует о выходе животных опытной группы из состояния стресса. В опытной группе, которой вводили яд пчелы дозой 1,0 мг/кг данный коэффициент оставался статистически значимо ($p < 0,05$) сниженным все 28 дней относительно интактных животных.

В отношении красной крови было показано, что изменений в содержании гемоглобина в периферической крови, а также общего содержания эритроцитов между группами обнаружено не было.

На 28 сутки после окончания курса «терапевтического» введения исследуемых препаратов у животных опытной группы I, которой перорально в составе наноконпозитов вводили пчелиный яд дозой 0,5 мг/кг количество клеток костного мозга в бедренной кости животных было статистически значимо ($p < 0,05$) выше значений контрольных значений и находилось на уровне интактных животных (рис.4).

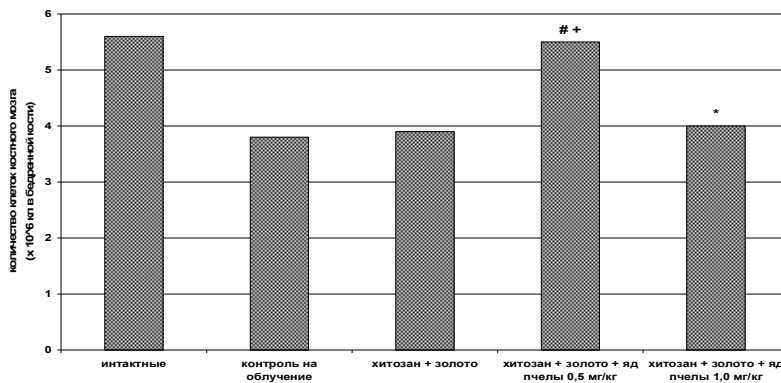


Рис. 4. Количество кроветворных клеток костного мозга ($\times 10^6$ кл; в бедренной кости) крыс после курсового перорального введения яда пчелы в составе наноконпозитов при предварительном гамма-облучении в дозе 5 Гр

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным; # - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль на облучение»; + - $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

У животных в группе, которой вводили наноконпозиты с пчелиным ядом в дозе 1,0 мг/кг количество клеток костного мозга было статистически значимо ($p < 0,05$) ниже чем у интактных и находилось на одном уровне со значениями контрольных групп.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что «терапевтическое» применение зоотоксинов пчелы в дозе 0,5 мг/кг в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» проявляет адаптогенную и антистрессорную эффективность на фоне повреждающего предварительного однократного облучения, которая увеличивалась и достигала уровня интактных животных к 28 суткам.

Адаптогенная эффективность пчелиного яда в составе наносистем «хитозан-золото» была также выявлена и в условиях моделирования лучевой болезни легкой степени тяжести (3Гр).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований можно заключить, что курсовое пероральное введение пчелиного яда в составе наноструктурированного биопрепарата «хитозан-золото» сопровождается развитием у экспериментальных животных в условиях относительной нормы адаптационной реакции устойчивой активации через неделю после окончания применения препаратов. Можно полагать, что отсроченное формирование активации обусловлено неполным всасыванием наносистем в кровь, а также с длительной диссоциацией компонентов яда от ядра наночастиц. Состояние устойчивой активации сопровождается изменением маркерных показателей адаптационных реакций: увеличением содержания лимфоцитов до верхней границы нормы, снижением содержания нейтрофилов до нижней границы нормы, увеличением значений лейкоцитарного коэффициента и индукцией антиоксидантной системы. Установлено, что исследуемые биопрепараты не влияют на количество эритроцитов. Предположительно, введение пчелиного яда лабораторным животным в составе наносистем вызывает активацию симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем, и как следствие стимуляцию защитных подсистем организма, в частности антиоксидантной.

Наши исследования показали, что реакция устойчивой активации, вызываемая профилактическим курсовым пероральным введением животным малых доз яда пчелы в составе наноструктурированного биопрепарата, сопровождается возникновением резистентности системы крови к действию ионизирующей радиации при костномозговой форме лучевой болезни. К наиболее значимым среди выявленных эффектов радиопротекторного действия исследуемых препаратов можно отнести сокращение времени процессов восстановления костного мозга и показателей периферической крови, снижение активности свободнорадикальных процессов у облученных животных.

Выявлено, что применение зоотоксина пчелы в составе наносистем при курсовом пероральном введении после однократного гамма-облучения в дозе 5Гр, ускоряет восстановительные процессы в системе крови и кроветворения, что, по всей видимости, обусловлено переходом поврежденного организма из состояния стресса в состояние устойчивой активации.

Результаты проведенных исследований предполагают практическую возможность создания, на основе пчелиного яда наноструктурированных препаратов предназначенных для перорального применения, способных повышать резистентность организма к повреждающему действию ионизирующей радиации.

ВЫВОДЫ

1. Курсовое пероральное введение крысам (в течение 7 суток) пчелиного яда (0,5 мг/кг) в составе наноструктурированного препарата «хитозан-золото» приводит к развитию адаптационной реакции устойчивой активации, характеризующейся увеличением емкости антиоксидантной системы и значения лейкоцитарного коэффициента, снижением содержания сегментоядерных нейтрофилов до нижней границы нормы и увеличением содержания лимфоцитов до верхней границы нормы.

2. Состояние адаптационной реакции устойчивой активации у крыс, вызванное профилактическим курсовым пероральным введением яда пчелы в составе наносистем сопровождается развитием радиорезистентности, которая характеризуется статистически значимым ($p < 0,05$) увеличением числа выживших лейкоцитов периферической крови, снижением интенсивности процессов пероксидации у животных экспериментальных групп по сравнению с животными контрольных групп (однократное гамма-облучение в дозе 5Гр) и сокращением времени процессов восстановления красного костного мозга.

3. Курсовое пероральное введение крысам зоотоксина пчелы в составе наносистем после однократного гамма-облучения (костномозговая форма лучевой болезни) приводит к статистически значимой ($p < 0,05$) нормализации показателей системы крови и переводом организма облученных животных из состояния стресса в состояние активации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

* - статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Таламанова М.Н. Определение типа адаптационной реакции при пероральном введении экспериментальным животным наночастиц золота, содержащих пчелиный яд / М.Н. Таламанова // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 8-11 апреля 2009 г.; Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. М.: МАКС Пресс, 2008. С. 228 – 229.

2. Таламанова М.Н. Адаптогенные свойства нанокompозитов на основе золота, хитозана и пчелиного яда при пероральном применении в условиях нормы / А.П. Баврина, **М.Н. Таламанова** // Нижегородская сессия молодых ученых. Естественнонаучные дисциплины 20-25 апреля 2008г., Н.Новгород, 2008. С.31.

3. **Таламанова М.Н.** Новый способ применения пчелиного яда в условиях повреждающего действия ионизирующей радиации / М.Н. Таламанова, А.С. Корягин, А.Д. Синельников // Материалы международной научно-практической конференции, 2008г.; Адлер – Рыбное: НИИП, 2009. С. 284 – 289.

4. **Таламанова М.Н.** Терапевтические эффекты пчелиного яда в составе нанокompозитов при моделировании лучевой болезни / М.Н. Таламанова, А.С. Корягин

// Материалы I Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (23-26 февраля 2009; г.Донецк). – Т. II. – Донецк, 2009. С. 70 – 71.

5. **Таламанова М.Н.** Радиозащитные свойства пчелиного яда при пероральном введении крысам / М.Н. Таламанова, А.Д. Синельщиков, А.С. Корягин // 9-я научно-практическая конференция «Интермед». Рыбное: НИИП, 2009. С. 216 – 220.

6*. Дерюгина А.В. Изменение реактивности крови крыс при различных способах введения пчелиного яда / А.В. Дерюгина, С.В. Копылова, **М.Н. Таламанова**, О.А. Чигарова, В.Н. Крылов // Вестник ННГУ. Серия Биология. №2. 2009. С. 107 – 110.

7*. Корягин А.С. Определение типа неспецифического адаптационного ответа у экспериментальных животных при пероральном применении пчелиного яда в составе наночастиц золота / А.С. Корягин, **М.Н. Таламанова**, Е.А. Александрова, А.Л. Маленев // Вестник ННГУ. Серия Биология. №3. 2009. С. 114 – 117.

8. Таламанова М.Н. О возможности перорального применения пчелиного яда при экспериментальном лучевом поражении / М.Н. Таламанова // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 13-18 апреля 2009 г.; Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. М.: МАКС Пресс, 2009. С. 279.

9. Mochalova A.E. Adaptogenic properties of interpolymer chitosan-bee poison complexes on matrix of aurum nanoparticles of under conditions of hypoxia and gamma-irradiation / A.E. Mochalova, A.S. Koryagin, L.A. Smirnova, **M.N. Talamanova**, E.A. Alexandrova // 9th International Conference of The European Chitin Society 23-26 may 2009: San Servolo Island: Venice – ITALY, P. 30 – 31.

10. **Таламанова М.Н.** Защитное действие пчелиного яда в составе наночастиц золота на систему крови при радиооблучении экспериментальных животных / М.Н. Таламанова, О.Ю. Ешкова, А.С. Корягин // Материалы II Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов (25-29 мая 2009г., Пермь): Изд-во ПГУ, 2009. С. 322 – 323.

11. Talamanova M.N. Protective action of bee venom in structure of nanocomposites of golden on system of blood at a radioirradiation of experimental animals / M.N. Talamanova, A.S. Koryagin, A.E. Mochalova // 13th annual Symposium for Biology Students of Europe – 30 July – 8 august 2009: Kazan – Russia, P. 112.

12.Корягин А.С. Радиопротекторные свойства наноматериалов на основе наночастиц золота с оболочкой из биологически активных полимеров / А.С. Корягин, А.Е. Мочалова, **М.Н. Таламанова**, Л.А. Смирнова // 6-я Российская конференция по радиохимии. Радиохимия-2009: Тезисы докладов. Москва, 12-16 октября 2009г. – Озерск: ФГУП «ПО «Маяк», 2009. С. 358-59.

13*. Корягин А.С. Биопрепараты пчелиного яда и хитозана структурированные на наночастицах золота – полифункциональные стимуляторы резистентности / А.С. Корягин, А.Е. Мочалова, **М.Н. Таламанова**, Л.А. Смирнова, А.Л. Маленев, Е.А. Александрова // Известия Самарского НЦ РАН, 2009. Т.11, № 1(6). С. 1291-1296.

Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Times.
Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз. Заказ 339.

Отпечатано в типографии
Нижегородского госуниверситета им. Н.И. Лобачевского
603000, Н. Новгород, ул. Б. Покровская, 37.