

На правах рукописи

Смердова Анна Вячеславовна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕПАРИНА ПРИ
ВВЕДЕНИИ ЭТАНОЛА И ПЧЕЛИНОГО ЯДА
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ**

03.03.01 – физиология

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2011

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

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Хомутов Александр Евгеньевич
доктор медицинских наук
Зимин Юрий Викторович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Смирнов Василий Филиппович
доктор биологических наук
Ягин Валерий Васильевич

Ведущая организация: Нижегородская государственная
медицинская академия

Защита состоится «10» « марта » 2011 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, биологический факультет.
Факс: (8312) 465-82-92

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан « 02 » февраля 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальной проблемой современной физиологии является изучение механизмов действия эндогенных биологически активных веществ, способных повышать резистентность организма к экстремальным факторам среды. Литературные данные, касающиеся свойств гепарина, указывают на возможность его участия в биохимических и физиологических механизмах защиты организма при воздействии токсических соединений. Гепарин нашел широкое применение в физиологии и медицине благодаря своим антикоагуляционным свойствам. Кроме того, исследования последних лет показали, что он является универсальным регулятором функций организма и играет существенную роль в поддержании гомеостаза. Помимо антикоагуляционной активности гепарин обладает цитостатическим (Mishra-Gorur, Castellot, 1999), бактериостатическим (Gori et al., 1999), антилипемическим (Nakala et al., 1999), радиопротективным (Лукашин, Софронов, 1996) действием, выявлены антиаллергический (Rice et al., 1998; Lever, Page, 2002) и гипотензивный (Litorowicz et al., 1998; Coombe, Kett, 2005) его эффекты. Сравнительно недавно была показана способность гепарина связывать и инактивировать природные токсины, входящие в состав пчелиного яда и некоторых змеиных ядов (Хомутов и др., 1985), а также взаимодействовать с некоторыми фармакологическими веществами (Хомутов и др., 1998). Исследования последних лет направлены на изучение центрального действия этого биополимера, его влияния на формирование поведения и память (Кондашевская и др., 2000; Никольская, Кондашевская, 2001).

Гепарин относится к одним из наиболее информативных биополимеров. Большинство биологических эффектов гепарина обусловлено его взаимодействием с мембранами клеток или образованием комплексов с ферментами или регуляторными соединениями. В результате гепарин принимает участие во многих процессах метаболизма в организме (Chen, Van der Meer, 1994; Liang et al., 2008).

Цель исследования: изучение физиологических и биохимических особенностей протекторного действия гепарина при введении экспериментальным животным пчелиного яда и этанола.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ протекторного действия гепарина при введении токсических доз этанола и пчелиного яда.
2. Изучить влияние экзогенного и эндогенного гепарина на гиподинамию, вызванную этанолом.
3. Исследовать влияние гепарина на показатели сердечно-сосудистой и респираторной систем в условиях воздействия этанола и пчелиного яда.
4. Оценить влияние гепарина, этанола и протамина сульфата на изменение активности лактат- и алкогольдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени.
5. Исследовать возможности химического взаимодействия гепарина с этанолом и пчелиным ядом *in vitro*.

Научная новизна. В работе впервые проведено комплексное исследование протекторных свойств гепарина при воздействии на организм экзогенного этанола и пчелиного яда. Установлено, что гепарин снижает токсичность пчелиного яда и этанола. Впервые показано, что предварительное введение этанола снижает токсические свойства пчелиного яда за счёт поступления в общий кровоток дополнительного количества эндогенного гепарина.

Экзогенный гепарин снижает продолжительность этанолового сна, уменьшает гиподинамию, вызванную введением этанола. Протамин сульфат, блокируя эндогенный гепарин, потенцирует гиподинамический эффект этанола.

Этанол и пчелиный яд снижают частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое артериальное давление. Совместное и предварительное введение гепарина с исследуемыми веществами блокирует кардио- и вазотропное действие исследуемых веществ.

Изучено влияние внутрибрюшинного введения крысам этанола на активность лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени. Показано, что гепарин способен устранять негативные последствия внутрибрюшинного введения этанола, а связывание эндогенного гепарина протамин сульфатом усиливает данное токсическое действие.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны основы представлений о стабилизации гепарином биохимических и физиологических функций организма в условиях действия экзогенного этанола и пчелиного яда. Полученные материалы расширяют и углубляют представления о регуляторной роли гепарина в поддержании гомеостаза организма. Результаты работы имеют важное практическое значение для клинической медицины в плане понимания молекулярных и биохимических механизмов действия гепарина, где он широко применяется как фармакологическое средство.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что экзогенный и эндогенный гепарин снижает токсическое действие этанола и пчелиного яда, снижает гиподинамический эффект этанола, устраняет кардиотропный и вазотропный эффекты пчелиного яда и этанола.

2. Введение этанола повышает активность лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы клеток печени. Предварительное введение гепарина стабилизирует показатели ферментов на исходном уровне. Введение протамин сульфата потенцирует изменения активности ферментов, характерные для введения этанола.

3. Раствор гепарина *in vitro* при взаимодействии с пчелиным ядом и этанолом изменяет оптические свойства полученной смеси как в видимой части, так и в УФ области спектров поглощения.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на 5-й Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2007), 3-м Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия 2010» (Н.Новгород, 2010), международной конференции «Пчеловодство. 21 век» (Москва, 2010).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа в объеме 141 листа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, 4 глав собственных исследований и обсуждения результатов, выводов, списка литературы и приложений. Библиография включает 245 источников (из них 106 отечественных и 139 иностранных). Работа содержит 38 рисунков, 16 таблиц и 2 схемы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на 320 белых лабораторных нелинейных крысах-самцах массой 180 – 200 г и 150 белых мышах массой 18 – 20 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. В работе были использованы следующие вещества: 1) Гепарин производства АО «Курган», содержащий 5000 МЕ в 1 мл раствора; 2) 30% раствор этанола; 3) пчелиный яд; 4) 1% раствор протамина сульфата.

Инъекции производились в утренние часы одним и тем же лицом.

При изучении седативных свойств этанол в дозе 4,5 г/кг, введенный внутрибрюшинно, вызывал у крыс наркотический сон (Lheugeux et al., 1993), продолжительность которого способна меняться при введении различных веществ (Буров, Ведерникова, 1985). Длительность этанолового сна используется как один из критериев оценки систем обмена этанола и ацетальдегида (Сатановская, 1990).

Изучение гиподинамии, вызванной наркотическим действием этилового спирта, проводилось на тредбане, который представлял плексигласовую камеру размером 1500 x 150 x 150 мм. Пол камеры представлял движущуюся ленту, причем скорость лентопротяжки регулировалась редуктором в широких пределах. Через каждые 150 мм на верхней панели камеры устанавливались легкие металлические флажки. До введения исследуемых веществ подбиралась такая скорость лентопротяжки (100 мм/с), при которой интактное животное могло воспроизводить заданный ритм в течение 2 часов. Если животное после введения этанола не выдерживало ритма движения, то передвигалось по ходу движения ленты тредбана, задевая за флажки. Этот процесс фиксировался визуально и номинировался как падение с тредбана в течение 1 мин.

Электрокардиограмма записывалась в трех стандартных отведениях. Для регистрации ЭКГ животные фиксировались на столе, лежа на спине. В дистальные отделы конечностей вводились тонкие инъекционные иглы, представляющие собой электроды кардиографа. По показателям ЭКГ высчитывалась частота сердечных сокращений. Давление измеряли кровавым методом в бедренной артерии. Регистрация давления осуществлялась посредством записи показаний ртутного манометра на ленте кимографа или с

помощью электроманометра ЭМ-02 с регистрацией на электросамописце НЗ20-3. Частоту дыхания измеряли при помощи пневмотахографа.

Взаимодействие гепарина с пчелиным ядом и этанолом *in vitro* изучали фотоколориметрическим методом, а также по изменению спектров поглощения данных веществ и их смесей в УФ и видимой области. Колориметрирование осуществляли на фотоэлектроколориметре КФК-3 при синем светофильтре (400 нм). Измерения спектров поглощения проводили на установке, функционально идентичной однолучевому спектрофотометру. Установка включала в себя источник света (водородная лампа или лампа накаливания), монохроматор МДР-12 с шаговым двигателем, синхронный детектор, светоприемную камеру, в которой размещались кварцевые кюветы с растворами, и фотоумножитель, подключенный к ЭВМ для автоматической регистрации данных. Исследуемые вещества разводили в фосфатном буфере (рН 7,2) или в дистиллированной воде, экстинкцию растворов измеряли относительно растворителей.

Митохондриальную и цитоплазматическую фракции клеток печени экспериментальных животных получали методом дифференциального центрифугирования (Эванз, 1990). Определение активности лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы производили общеизвестными методами (Кочетов, 1980; Северин, Соловьева, 1989).

Статистическая обработка результатов была проведена с применением t-критерия Стьюдента с использованием программы Primer of Biostatistics, 4th Edition, S.A.Glantz, McGraw-Hill.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация гепарином токсического и седативного действия этанола и пчелиного яда

Пчелиный яд данного образца в дозе $7,0 \pm 0,9$ мг/кг вызывал гибель 50% экспериментальных животных ($ДЛ_{50}$). Предварительная инкубация пчелиного яда с гепарином приводила к значительному ослаблению его токсических свойств. Так, при соотношении компонентов смеси яд-гепарин 1:0,5 $ДЛ_{50}$ возрастала примерно в 2,5 раза (до $17,4 \pm 1,8$ мг/кг), а при увеличении количества гепарина в смеси в 10 раз была вдвое выше, чем в контроле – $14,1 \pm 1,2$ мг/кг. Доза, вызывающая в эксперименте гибель всех мышей ($ДЛ_{100}$), равнялась 15,0 мг/кг. При добавлении к пчелиному яду гепарина в соотношении яд-гепарин 1:0,5 $ДЛ_{100}$ возрастала до $25,0 \pm 3,4$ мг/кг, а при соотношении компонентов смеси 1:5 была несколько ниже ($19,0 \pm 2,1$), но, тем не менее, значительно превышала контрольное значение. Блокирование эндогенного гепарина его антагонистом протамин сульфатом вызывало заметное увеличение токсичности пчелиного яда, $ДЛ_{50}$ в этом случае составила $5,1 \pm 0,3$ мг/кг.

Антидотное действие гепарина проявлялось не только при взаимодействии с пчелиным ядом *in vitro*, но и при инъекции его лабораторным животным. Введение 5, 50, 500 и 5000 МЕ/кг гепарина мышам за 10 минут до инъекции летальной дозы яда способствовало выживанию

соответственно 18, 68, 35 и 26% экспериментальных животных (рис. 1). Кроме того, гепарин оказывал не менее сильное защитное действие даже при его поступлении в организм на фоне действия яда. При инъекции тех же доз гепарина через 10 минут после введения зоотоксина в эксперименте выживало 15, 60, 50 и 40% мышей соответственно (рис. 1). Как и в случае введения животным смеси яд-гепарин, максимальный протективный эффект наблюдался при определенной дозе гепарина. В наших экспериментах эта доза была 50 МЕ/кг, при десятикратном увеличении или уменьшении количества гепарина выживаемость животных заметно уменьшалась.

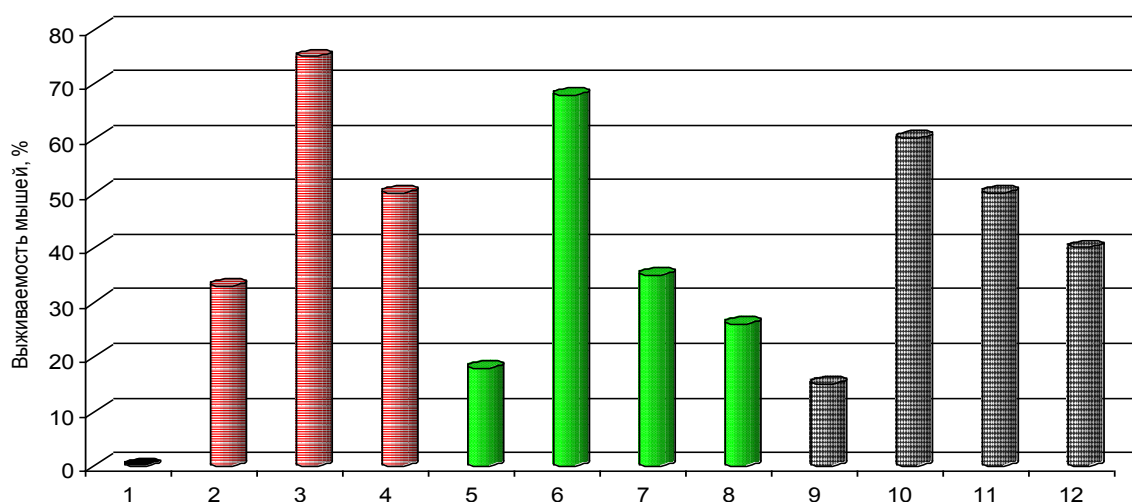


Рис.1. Выживаемость мышей при введении пчелиного яда в дозе ДЛ₁₀₀ в сочетании с гепарином

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Пчелиный яд (15 мг/кг) | 7. Яд на фоне гепарина (500 МЕ/кг) |
| 2. Смесь яд-гепарин (1:0,05) | 8. Яд на фоне гепарина (5000 МЕ/кг) |
| 3. Смесь яд-гепарин (1:0,5) | 9. Гепарин (5 МЕ/кг) на фоне яда |
| 4. Смесь яд-гепарин (1:5) | 10. Гепарин (50 МЕ/кг) на фоне яда |
| 5. Яд на фоне гепарина (5 МЕ/кг) | 11. Гепарин (500 МЕ/кг) на фоне яда |
| 6. Яд на фоне гепарина (50 МЕ/кг) | 12. Гепарин (5000 МЕ/кг) на фоне яда |

При внутрибрюшинном введении этанола в дозе 16 г/кг (ДЛ₁₀₀) все экспериментальные животные в течение суток погибали (рис. 2). Совместное введение этанола и гепарина в виде смеси увеличивало процент выживших мышей, причём максимальный эффект наблюдался при весовом соотношении этанол-гепарин 1000:50. Уменьшение (1000:10) или увеличение (1000:70) концентрации гепарина в смеси сопровождалось меньшим протекторным эффектом (рис. 2).

Аналогичная картина наблюдалась при введении этанола на фоне действия гепарина. При предварительном введении гепарина в дозе 5000 МЕ/кг выживаемость мышей после инъекции этанола достигала 60%. Меньший протекторный эффект регистрировался при предварительном введении гепарина как в дозе 1000 и 2500 МЕ/кг, так и при инъекции в дозе 7000 МЕ/кг (рис. 2).

Таким образом, гепарин выступает в качестве протектора при введении летальных доз, как пчелиного яда, так и этанола. Протекторный эффект в

значительной мере зависит от концентрации гепарина в инъектируемой смеси или от дозы гепарина, вводимого до или после пчелиного яда и этанола. Сравнивая протекторное действие гепарина в отношении пчелиного яда и этанола, следует отметить, что максимальный антидотный эффект регистрируется в смеси яд-гепарин в соотношении 1:0,5, а в смеси этанол-гепарин - 1000:50. Максимальный протекторный эффект гепарина проявляется при его до и после введения пчелиного яда в дозе 50 МЕ/кг, а при введении этанола – 5000 МЕ/кг.

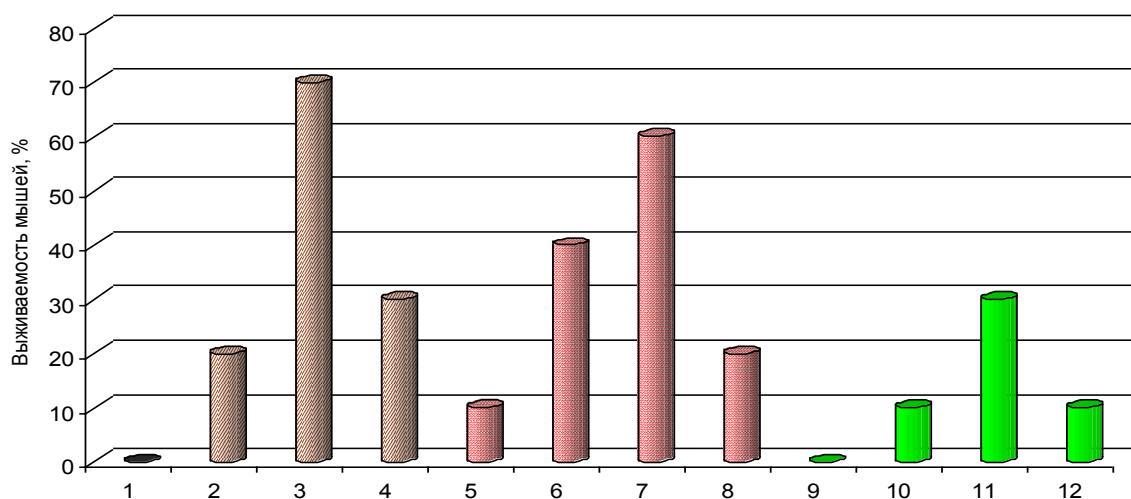


Рис. 2. Выживаемость мышей при введении этанола в дозе ДЛ₁₀₀ в сочетании с гепарином

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Этанол (16 г/кг) | 7. Этанол → гепарин (5000 МЕ/кг) |
| 2. Смесь этанол-гепарин (1000:10) | 8. Этанол → гепарин (7000 МЕ/кг) |
| 3. Смесь этанол-гепарин (1000:50) | 9. Гепарин (1000 МЕ/кг) → этанол |
| 4. Смесь этанол-гепарин (1000:70) | 10. Гепарин (2500 МЕ/кг) → этанол |
| 5. Этанол → гепарин (1000 МЕ/кг) | 11. Гепарин (5000 МЕ/кг) → этанол |
| 6. Этанол → гепарин (2500 МЕ/кг) | 12. Гепарин (7000 МЕ/кг) → этанол |

Предварительное введение этанола в дозе 5,0 г/кг при интоксикации пчелиным ядом в дозе 15 мг/кг сопровождалось увеличением количества выживших в течение суток особей до 78%. Количество выживших крыс при инъекции этанола на фоне действия пчелиного яда зависело от времени, прошедшего между инъекцией апитоксина и этилового спирта. Так, введение этанола через 10 мин после инъекции яда сопровождалось выживанием 52% крыс, а введение через 40 мин – только 12%.

Ранее, в экспериментах на крысах нами было показано, что при интоксикации пчелиным ядом в качестве неспецифического антидотного средства может быть использован гепарин, применённый как в виде смеси с ядом и его предварительном введении, так и инъекции гепарина на фоне действия пчелиного яда.

Для исследования возможного механизма антидотного эффекта этанола был проведён ряд экспериментов, в которых производилась оценка уровня эндогенного гепарина при введении этанола и совместного применения этанола и пчелиного яда (табл. 1).

Таблица 1

Изменение уровня свободного гепарина периферической крови при введении пчелиного яда и этанола (%)

Условия эксперимента	Время после введения, мин			
	10	20	30	40
Контроль (физ. р-р)	101,0±5,0	96,0±3,2	99,0±2,8	104,0±4,7
Пчелиный яд (15,0 мг/кг)	728,0±63,3*	546,0±22,9*	351,0±18,6*	224,0±29,4*
Этанол (5 г/кг)	529,0±41,3*	484,0±38,1*	445,0±28,5*	492,0±31,7*
Пчелиный яд на фоне этанола	945,0±94,2*	722,0±58,8*	694,0±42,3*	625,0±44,7*
Этанол на фоне пчелиного яда	766,0±45,3*	483,0±32,1*	264,0±18,6*	185,0±12,8*

* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ($p < 0,05$)

Эксперименты показали, что введение физиологического раствора в объёме 0,5 мл не влияет на гепариновый статус периферической крови. Введение пчелиного яда в дозе 15,0 мг/кг сопровождается резким повышением уровня свободного гепарина через 10 мин после инъекции. Со временем уровень гепарина снижается, однако через 40 мин он не достигает контрольных величин (табл. 1).

При введении пчелиного яда на фоне этанола уровень свободного гепарина в периферической крови также повышается с последующим медленным понижением показателей и к 40-й мин после инъекции более чем в 6 раз превышает исходные величины (табл. 1).

Иная картина наблюдается при введении этанола на фоне действия апитоксина. В этом случае уровень свободного гепарина падает со временем и как бы повторяет картину, характерную для серии опытов, в которых применялся только пчелиный яд (табл. 1).

В наших экспериментах внутрибрюшинное введение крысам этанола в дозе 5 г/кг вызывало у них сон, средняя продолжительность которого составила $126,2 \pm 6,7$ мин. При предварительном введении крысам гепарина в дозах 500, 1000, 2500, 5000 МЕ/кг наблюдалось уменьшение продолжительности сна и увеличение времени засыпания, вызванного внутрибрюшинным введением этанола. Следует отметить, что с увеличением дозы предварительно введенного гепарина с 500 МЕ/кг до 2500 МЕ/кг продолжительность этанолового сна у экспериментальных животных последовательно снижалась с $126,2 \pm 6,7$ мин в контроле при введении только этанола до $52,9 \pm 2,2$ мин при предварительном введении гепарина в дозе 2500 МЕ/кг.

При предварительном введении гепарина в дозе 5000 МЕ/кг, следуя дозозависимой тенденции, можно было предполагать, что произойдет

дальнейшее снижение времени этанолового сна. Однако при указанной дозе гепарина продолжительность этанолового сна недостоверно увеличивалась относительно предыдущей дозы, но, естественно, была достоверно меньше контрольных величин.

При совместном введении крысам гепарина в дозе 2500 МЕ/кг и этанола 5 г/кг в виде смеси также наблюдалось максимальное уменьшение времени этанолового сна. Отличия достоверны и составляют ($p < 0,01$) по сравнению с группой животных, которым вводили только этанол 5 г/кг.

Следующим этапом наших исследований явилось изучение роли эндогенного гепарина в защите организма от больших доз экзогенного этанола. Для этого вводили крысам этанол на фоне антагониста гепарина - протамин сульфата в дозе 10 мг/кг. Показано (Хомутов, 1980), что данная доза протамин сульфата способна полностью связать эндогенный гепарин у крыс с образованием комплексных соединений, в которых активность и протамин сульфата и эндогенного гепарина в значительной степени снижается.

Внутрибрюшинное введение этанола в дозе 5 г/кг на фоне инъекции протамин сульфата в дозе 10 мг/кг достоверно ($p < 0,001$) увеличивало продолжительность этанолового сна и уменьшало время засыпания у крыс по сравнению с показателем группы, которой вводился только этанол в дозе 5 г/кг.

При внутрибрюшинном введении этанола в дозе 2 г/кг через 1 мин после инъекции двигательная активность крыс не отличалась от интактных животных. С течением времени двигательная активность экспериментальных животных снижалась, что выражалось в увеличении количества падений с тредбана. Максимальный эффект гиподинамической реакции, вызванной этанолом, наблюдался через 20 мин после введения и соответствовал $4,1 \pm 0,5$ падений.

Введение гепарина в дозе 25 и 250 МЕ/кг в смеси с этанолом (2 г/кг) несколько снижает гиподинамический эффект этанола, но, тем не менее, показатели двигательной активности животных практически соответствуют показателям первой серии экспериментов.

Увеличение концентрации гепарина в смеси с этанолом до 2500 МЕ/кг блокирует тестовую дозу этанола, и количество падений с тредбана в большинстве случаев равно нулю. Аналогичные результаты были получены при предварительном введении гепарина в дозе 2500 МЕ/кг с последующей инъекцией этанола.

В наших экспериментах предварительное введение протамин сульфата в дозе 10 мг/кг сопровождалось повышением уровня гиподинамии животных, что выражалось в увеличении количества падений с тредбана до $7,9 \pm 0,4$ через 40 мин после введения этанола.

Таким образом, совместное применение гепарина с этанолом в виде смеси, а также предварительное введение экзогенного гепарина в значительной степени снижало гиподинамический эффект этанола. Блокада

эндогенного гепарина протамина сульфатом, напротив, пролонгировала этот эффект этилового спирта.

Влияние гепарина на кардиотропные и респираторные эффекты пчелиного яда и этанола

При внутрибрюшинном введении пчелиного яда в дозе 5 мг/кг частота сердечных сокращений (ЧСС) снижается с 262 ± 14 уд/мин в контроле до своих минимальных значений ($216 \pm 3,2$ уд/мин) через 40 мин после инъекции яда (рис. 3). Введение смеси яд-гепарин в соотношении 1:0,5, в которой доза яда соответствует 5 мг/кг, а также предварительное введение гепарина в дозе 500 МЕ/кг, достоверно не влияет на ЧСС экспериментальных животных и варьирует в пределах 242 – 270 уд/мин (рис. 3). Иная картина наблюдается при введении пчелиного яда на фоне протамина сульфата, являющегося, как известно, классическим блокатором эндогенного гепарина. В этом случае максимальная брадикардия (209 ± 11 уд/мин) регистрируется на 50-й мин от момента введения (рис. 3).

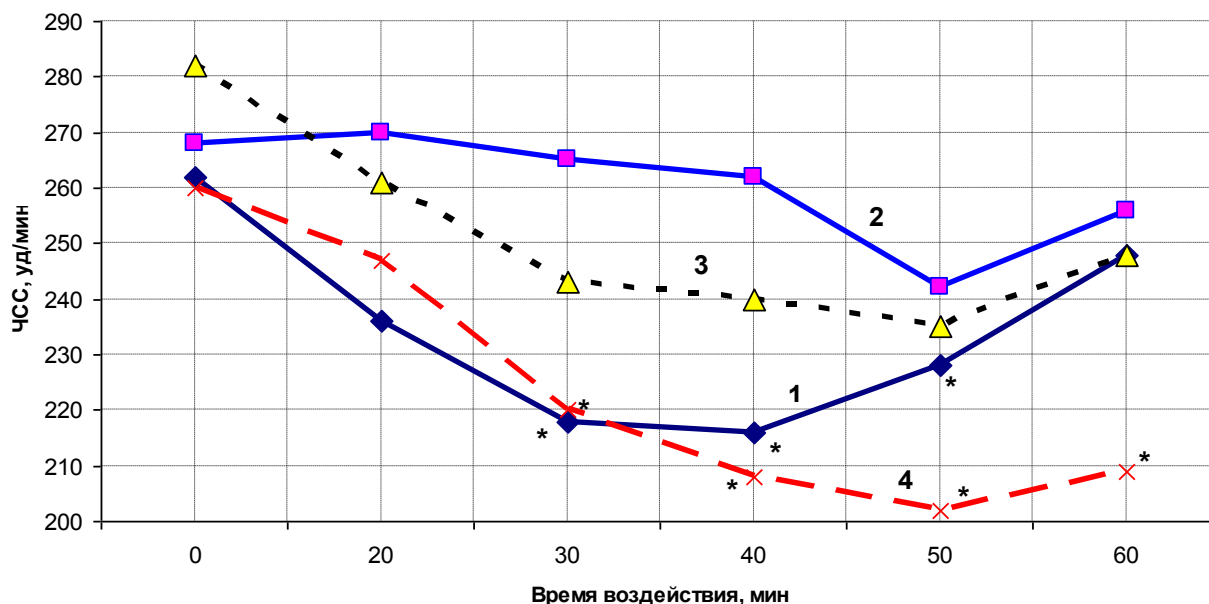


Рис. 3. Изменение ЧСС (уд/мин) при действии пчелиного яда, гепарина и протамина сульфата

- 1 – Яд пчелы (5 мг/кг) 3 – Гепарин (500 МЕ/кг) → яд (5 мг/кг)
 2 – Яд + Гепарин (1:0,5) 4 – Протамин (10 мг/кг) → яд (5 мг/кг)

* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ($p < 0,05$)

Введение этанола в дозе 2 г/кг сопровождается достоверным снижением ЧСС уже на 20-й мин от момента внутрибрюшинной инъекции. Однако на 60-й мин достоверных различий с исходной величиной не регистрируется, т.е. наблюдается восстановление ЧСС (рис. 4). При введении смеси этанол-гепарин в весовом соотношении 1000:50 и введение этанола на фоне действия гепарина (5000 МЕ/кг) наблюдается брадикардия, однако изменения ЧСС достоверно не отличаются от исходных величин (рис. 4).

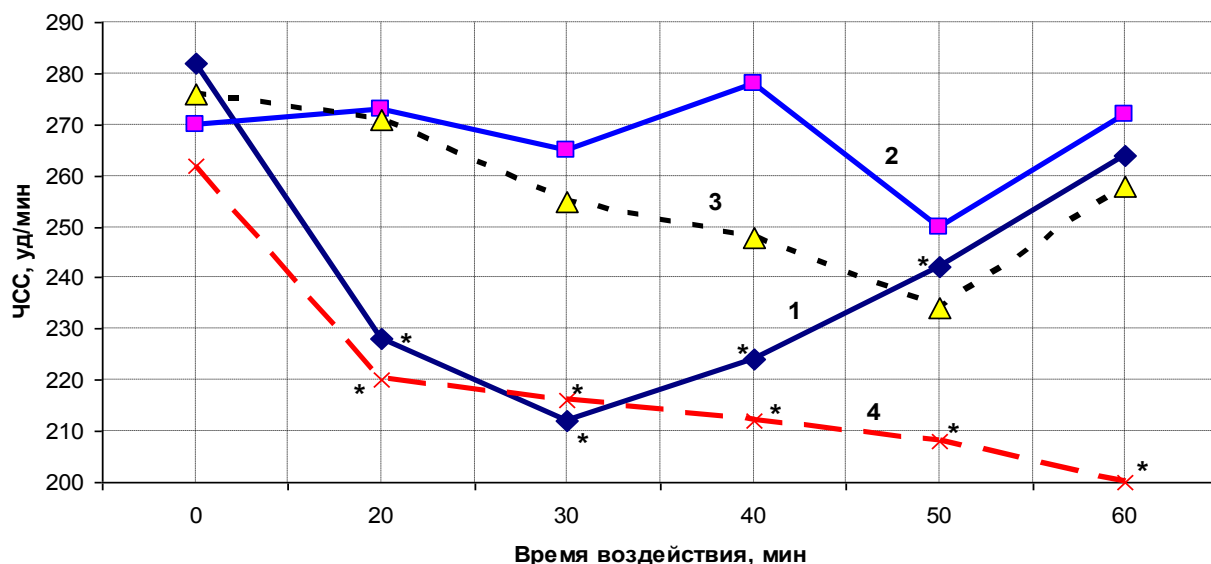


Рис. 4. Изменение ЧСС (уд/мин) при действии этанола, гепарина и протамина сульфата

- 1 - Этанол (2 г/кг) 3 - Гепарин (5000 МЕ/кг) → этанол
 2 - Этанол + Гепарин (1000:50) 4 - Протамин (10 мг/кг) → этанол

* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ($p < 0,05$)

Блокада эндогенного гепарина, путём предварительного введения протамина сульфата в дозе 10 мг/кг, сопровождается снижением ЧСС с 262 ± 17 уд/мин в контроле до 200 ± 14 уд/мин на 60-й мин от момента инъекции этанола (рис. 4).

Таким образом, гепарин стабилизирует показатели ЧСС как при введении пчелиного яда, так и этанола. Однако если концентрация гепарина в смеси яд-гепарин равна 50 МЕ/мл, то в смеси этанол гепарин она равна 5000 МЕ/мл. Оптимальной протекторной дозой при предварительном введении гепарина в экспериментах с пчелиным ядом является 500 МЕ/кг, для этанола – 5000 МЕ/кг. Кроме того, одним из доказательств протекторного действия гепарина в отношении пчелиного яда и этанола является блокада эндогенного гепарина, при которой действие исследуемых веществ пролонгируется.

Внутрибрюшинное введение пчелиного яда в дозе 5 мг/кг сопровождается достоверным снижением систолического артериального давления (АД-систолическое) со 154 ± 10 мм рт.ст. в контроле до $103 \pm 3,6$ мм рт.ст. на 60-й мин от момента введения яда (рис. 5).

При сочетанном применении гепарина и пчелиного яда в виде смеси в соотношении 1:0,5, или при предварительном введении гепарина в дозе 500 МЕ/кг АД-систолическое повышается, однако, следует отметить, что гипертонические явления, вызванные совместным применением гепарина и яда, в большинстве случаев не имеют достоверных различий относительно контрольных величин (рис. 5).

При введении пчелиного яда в дозе 5 мг/кг на фоне действия протамина сульфата наблюдаются гипотензивные явления, характерные для серии

экспериментов, в которой инъецировался только пчелиный яд в той же дозе (рис. 5).

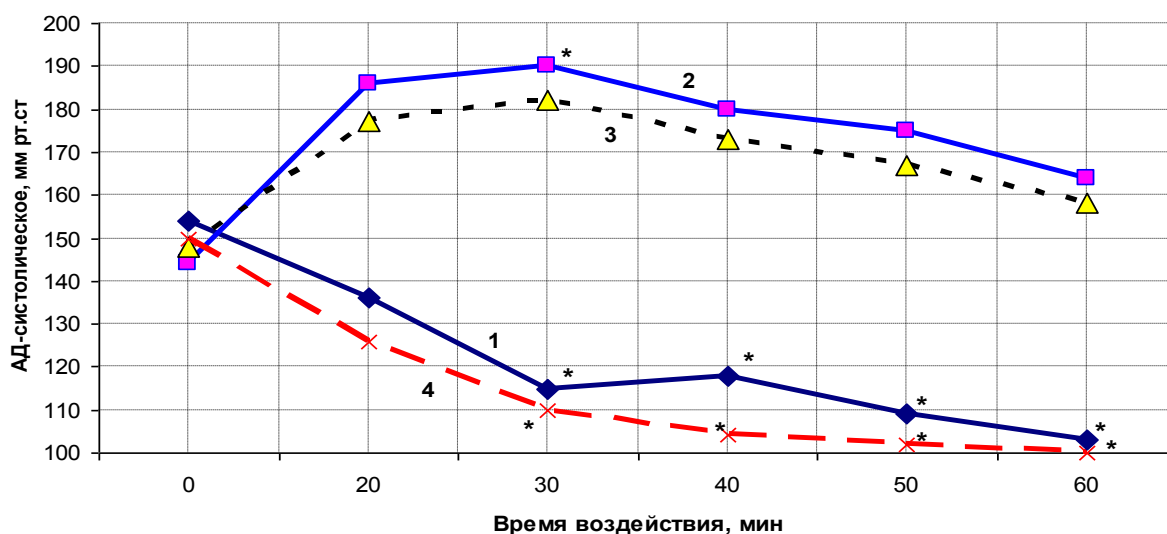


Рис. 5. Изменение АД-систолического (мм рт.ст.) при действии пчелиного яда, гепарина и протамина сульфата

- 1 – Яд пчелы (5 мг/кг) 3 – Гепарин (500 МЕ/кг) → яд
 2 – Яд + Гепарин (1:0,5) 4 – Протамина (10 мг/кг) → яд

* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ($p < 0,05$)

Введение этанола в дозе 2 г/кг, также как и инъекция пчелиного яда, сопровождается снижением АД-систолического, причём, начиная с 20-й мин, показатели гипотензии достоверно отличаются от исходных величин (рис. 6).

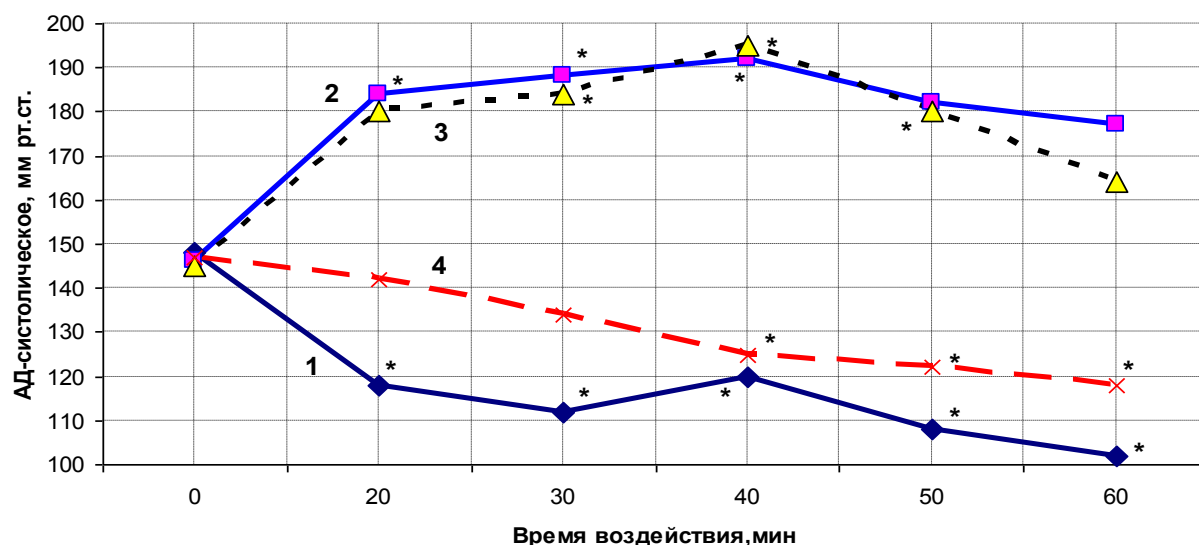


Рис. 6. Изменение АД-систолического (мм рт.ст.) при действии этанола, гепарина и протамина сульфата

- 1 – Этанол (2 г/кг) 3 – Гепарин (5000 МЕ/кг) → этанол
 2 – Этанол + Гепарин (1000:50) 4 – Протамина (10 мг/кг) → этанол

* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ($p < 0,05$)

Обратная картина наблюдается при совместном введении этанола и гепарина. Как при введении в виде смеси этанол-гепарин в соотношении 1000:50, так и при предварительном введении гепарина в дозе 5000 МЕ/кг регистрируется гипертензия, при которой показатели АД-систолического достоверно отличаются от исходных величин. Блокада эндогенного гепарина протамин сульфатом сопровождается снижением артериального давления, как и в случае с пчелиным ядом (рис.6).

При введении пчелиного яда в дозе 5 мг/кг диастолическое артериальное давление (АД-диастолическое), также как и АД-систолическое, снижается и к 60-й мин соответствует $54 \pm 10,0$ мм рт.ст. (контроль $86 \pm 4,8$ мм рт.ст.). При совместном применении пчелиного яда и гепарина в смеси или при предварительном введении гепарина АД-диастолическое повышается, причём на 40-й и 50-й мин отмечается достоверное различие с исходными величинами. Введение протамин сульфата сопровождается снижением АД-диастолического. При введении этанола в дозе 2 г/кг АД-диастолическое снижается, достигая достоверного минимума к 40-й – 50-й мин. При совместном применении этанола и гепарина при тех же условиях опыта, что и в серии с пчелиным ядом, АД-диастолическое достоверно увеличивается, достигая своего максимума при предварительном введении к 20 мин от момента инъекции этанола. Протамин сульфат, как и во всех предыдущих экспериментах, потенцирует действие этанола.

При внутрибрюшинном введении яда пчелы в дозе 5 мг/кг частота дыхательных движений достоверно увеличивается через 20 мин после введения яда. Гипервентиляция сохраняется в течение всего времени наблюдения (рис. 7).

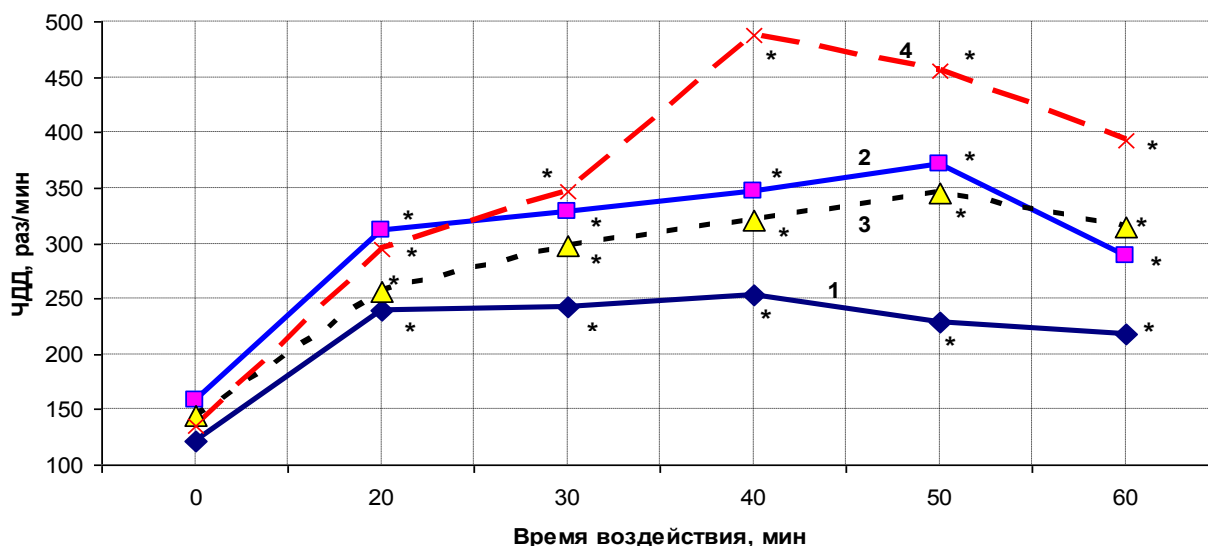


Рис. 7. Изменение ЧДД (раз/мин) при действии пчелиного яда, гепарина и протамин сульфата

- 1 – Яд пчелы (5 мг/кг) 3 – Гепарин (500 МЕ/кг) → яд
 2 – Яд + Гепарин (1:0,5) 4 – Протамин (10 мг/кг) → яд

* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ($p < 0,05$)

При совместном применении пчелиного яда и гепарина, а также введение пчелиного яда на фоне инъекции протамин сульфата сопровождается достоверным увеличением частоты дыхательных движений (рис. 7).

Аналогичная тенденция увеличения частоты дыхательных движений регистрируется при введении этанола, совместном применении этанола и гепарина, а также протамин сульфата и этанола (рис. 8).

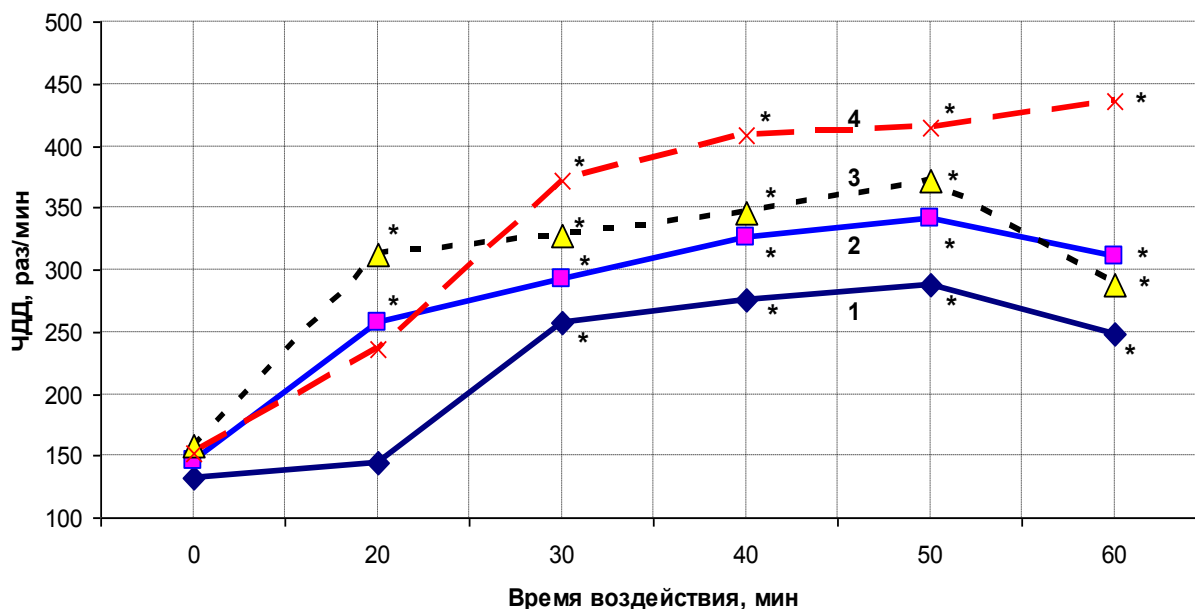


Рис.8. Изменение ЧДД (раз/мин) при действии этанола, гепарина и протамин сульфата

1 – Этанол (2 г/кг)

3 – Гепарин (5000 МЕ/кг) → этанол

2 – Этанол + Гепарин (1000:50)

4 – Протамин (10 мг/кг) → этанол

* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ($p < 0,05$)

Влияние этанола, гепарина и протамин сульфата на изменение активности лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени

Введение экспериментальным животным этанола в дозе 4,5 г/кг приводит в цитоплазматической фракции к резкому увеличению активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции и ее снижению в обратной (табл. 2), что свидетельствует о смещении равновесия реакции в сторону образования лактата. Аналогичные изменения активности алкогольдегидрогеназы происходят в данной фракции - показатели активности прямой реакции резко возрастают (табл. 3), в результате чего из этанола начинает активно нарабатываться ацетальдегид.

В митохондриальной фракции клеток печени наблюдается резкое повышение активности данных ферментов как в прямой, так и в обратной реакции (табл. 4, 5), что, по-видимому, направлено на снятие токсических эффектов экзогенного этанола.

Таблица 2

Активность лактатдегидрогеназы (нмоль/мин на мг белка) в цитоплазматической фракции клеток печени крыс при введении гепарина, этанола, протамин сульфата, и при их совместном действии

Группа	Лактатдегидрогеназа	
	Прямая реакция	Обратная реакция
Контроль	692,3±39,2	975,2±55,3
Этанол	1330,0±51,2***	800,9±58,2*
Гепарин + Этанол	1210,0±51,3***	1090,0±53,6 ^o
Протамин сульфат + Этанол	1391,0±65,1***	857,1±58,2
Протамин сульфат + Гепарин + Этанол	1213,0±53,2***	319,1±24,1*** ^{ooo} ^^^#

Таблица 3

Активность алкогольдегидрогеназы (нмоль/мин на мг белка) в цитоплазматической фракции клеток печени крыс при введении гепарина, этанола, протамин сульфата, а также при их совместном действии

Группа	Алкогольдегидрогеназа	
	Прямая реакция	Обратная реакция
Контроль	136,8±7,8	212,2±12,1
Этанол	183,1±22,1*	190,7±17,4
Гепарин + Этанол	43,6±2,9*** ^{ooo}	134,5±8,1*** ^{oo}
Протамин сульфат + Этанол	59,2±2,6*** ^{ooo}	72,8±5,8*** ^{ooo}
Протамин сульфат + Гепарин + Этанол	169,6±10,9*^^^#	95,1±5,4***^#

Предварительное введение животным гепарина в дозе 250 МЕ/кг частично снимает эффекты внутрибрюшинного введения этанола, что выражается в изменении показателей активности исследуемых ферментов.

В митохондриальной и цитоплазматической фракциях активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции снижается, а в обратной – увеличивается (табл. 2, 4), что свидетельствует о снижении соотношения лактат/пируват и преимущественном смещении равновесия ферментативной реакции в сторону образования пирувата, то есть в сторону усиления аэробного гликолиза.

Активность алкогольдегидрогеназы в прямой реакции снижается в значительной степени в обеих фракциях, в обратной – возрастает в

митохондриальной и снижается в цитоплазматической фракции (табл. 3, 5). В целом, равновесие ферментативной реакции смещается в сторону образования этанола из ацетальдегида. Таким образом, гепарин способен эффективно снижать токсические эффекты больших доз этанола, что выражается в резком уменьшении длительности этанолового сна (с $94,0 \pm 8,8$ мин в группе этанол до $42,1 \pm 3,0$ мин в группе гепарин + этанол) и нормализации работы ферментов.

Таблица 4

Активность лактатдегидрогеназы (нмоль/мин на мг белка) в митохондриальной фракции клеток печени крыс при введении гепарина, этанола, протамин сульфата и при их совместном действии

Группа	Лактатдегидрогеназа	
	Прямая реакция	Обратная реакция
Контроль	$418,1 \pm 24,5$	$509,4 \pm 22,9$
Этанол	$720,7 \pm 44,3^{***}$	$1135,0 \pm 80,6^{***}$
Гепарин + Этанол	$622,2 \pm 43,6^{***}$	$1352,0 \pm 54,3^{***\circ}$
Протамин сульфат + Этанол	$523,0 \pm 24,6^{***\circ\circ}$	$617,6 \pm 44,2^{*\circ\circ}$
Протамин сульфат + Гепарин + Этанол	$670,6 \pm 37,1^{***\wedge\wedge}$	$1758,0 \pm 69,9^{***\wedge\wedge\#}$

Таблица 5

Активность алкогольдегидрогеназы (нмоль/мин на мг белка) в митохондриальной фракции клеток печени крыс при введении гепарина, этанола, протамин сульфата, и при их совместном действии

Группа	Алкогольдегидрогеназа	
	Прямая реакция	Обратная реакция
Контроль	$61,7 \pm 5,2$	$96,1 \pm 6,1$
Этанол	$114,1 \pm 8,6^{***}$	$181,8 \pm 17,6^{***}$
Гепарин + Этанол	$44,6 \pm 5,2^{*\circ\circ}$	$245,0 \pm 9,1^{***\circ\circ}$
Протамин сульфат + Этанол	$86,0 \pm 4,3^{***\circ\circ}$	$116,6 \pm 4,0^{*\circ\circ}$
Протамин сульфат + Гепарин + Этанол	$135,1 \pm 8,5^{***\wedge\wedge\#}$	$150,9 \pm 7,1^{***\wedge\wedge\#}$

достоверное отличие от контрольной группы *- ($p < 0,05$), **- ($p < 0,01$), ***- ($p < 0,001$); достоверное отличие от группы этанол $^{\circ}$ - ($p < 0,05$), $^{\circ\circ}$ - ($p < 0,01$), $^{\circ\circ\circ}$ - ($p < 0,001$); достоверное отличие от группы протамин сульфат + этанол $^{\wedge}$ - ($p < 0,05$), $^{\wedge\wedge}$ - ($p < 0,01$), $^{\wedge\wedge\wedge}$ - ($p < 0,001$); достоверное отличие от группы гепарин + этанол $^{\#}$ - ($p < 0,001$)

Введение протамин сульфата в дозе 10 мг/кг животным при предварительном введении этанола приводит к резкому увеличению продолжительности сна: она возрастает почти в 2,5 раза по сравнению с группой, которой вводится этанол (с $94,0 \pm 8,8$ до $233,6 \pm 19,9$ мин). Инактивация эндогенного гепарина также ведет к изменениям в работе исследуемых ферментативных систем. В митохондриальной фракции активность обоих ферментов возрастает, однако в гораздо меньшей степени, чем в группе, которой вводится этанол (табл. 4, 5). Связывание эндогенного гепарина приводит к тому, что активность ферментов не может возрасти в степени, достаточной для снятия токсических эффектов экзогенного этанола. В цитоплазматической фракции активность лактатдегидрогеназы резко возрастает в прямой реакции (табл. 2), что свидетельствует об активном образовании лактата. Активность же алкогольдегидрогеназы в данной фракции снижается в обеих реакциях более чем в два раза (табл. 3), что говорит о сильном воздействии, которому подвергается данная ферментативная система. Таким образом, связывание эндогенного гепарина протамин сульфатом приводит к усилению токсических эффектов, вызванных инъекцией большой дозы этанола. По-видимому, гепарин в нормальных физиологических условиях способен выполнять в организме роль эндогенного антидота к токсинам.

Экзогенный гепарин действует однонаправленно с эндогенным, что показано в опытах с последовательным введением протамин сульфата и гепарина. У животных данной группы продолжительность этанолового сна сокращается более чем в два раза по сравнению с группой, которой этанол вводится на фоне протамин сульфата (с $233,6 \pm 19,9$ до $105,5 \pm 8,7$ мин). Активность лактатдегидрогеназы в митохондриальной фракции возрастает, особенно сильно в обратной реакции (табл. 4), что свидетельствует об активном образовании пирувата из лактата. Также повышается активность алкогольдегидрогеназы, причем в обратной реакции она больше, чем в прямой (табл. 5), то есть из токсического соединения ацетальдегида образуется этанол. В цитоплазматической фракции активность лактатдегидрогеназы снижается в прямой реакции (табл. 2), что свидетельствует об уменьшении соотношения лактат/пируват, однако в обратной реакции она ниже по сравнению с группой гепарин + этанол. Активность алкогольдегидрогеназы повышается в обратной реакции, однако показатели также ниже, чем в группе гепарин + этанол (табл. 3).

Таким образом, экзогенный гепарин способен компенсировать предварительное связывание эндогенного гепарина протамин сульфатом, однако однократное введение экзогенного гепарина явно не достаточно для улучшения работы ферментативных систем, что указывает на суммацию действия эндогенного и экзогенного гепарина.

Взаимодействие гепарина с пчелиным ядом и этанолом *in vitro*

При концентрации в растворе пчелиного яда 1 мг/мл максимальное светопоглощение смеси наблюдалось при содержании гепарина 30 МЕ/мл, а при увеличении или уменьшении количества гепарина экстинкция смеси снижалась. Два гораздо менее выраженных пика наблюдались при содержании гепарина 80 и 5 МЕ/мл (рис. 9).

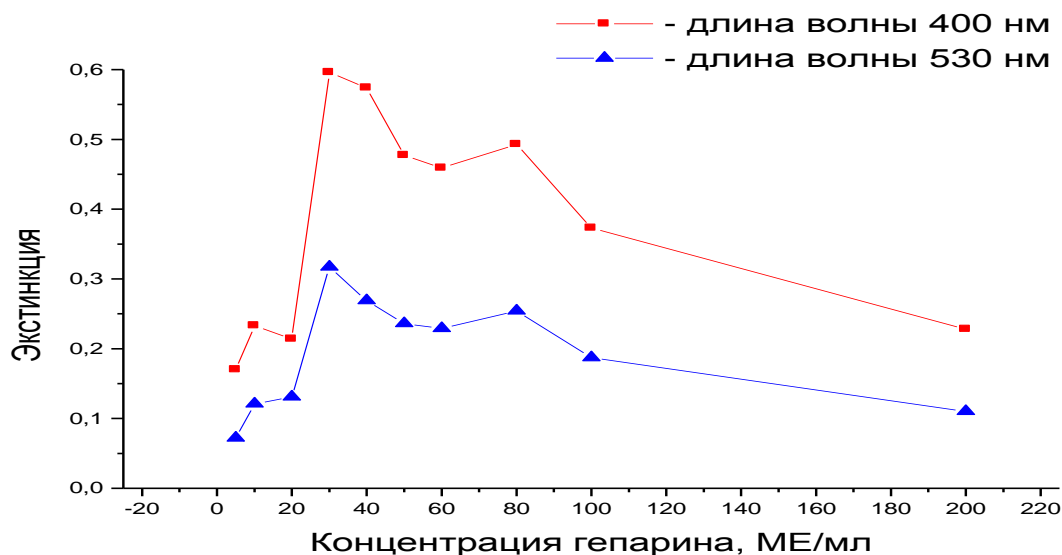


Рис. 9. График изменений светопоглощения раствора пчелиный яда (1 мг/мл) - гепарин (5–200 МЕ/мл)

Таким образом, наиболее эффективное взаимодействие наблюдалось в смеси, содержащей 30 МЕ гепарина на 1 мг пчелиного яда. Измерения проводили при зеленом (530 нм) и синем (400 нм) светофильтре; поскольку в последнем случае чувствительность была выше, то все последующие эксперименты по фотоколориметрии проводили при 400 нм.

Оценка оптической плотности раствора этанол-гепарин, в котором концентрация этанола составляла 1 мл, а концентрация гепарина увеличивалась от 500 до 7000 МЕ/мл, показала, что максимальная экстинкция регистрируется при содержании в растворе 1 мл этанола и 5000 МЕ/мл гепарина. Концентрации гепарина ниже и выше оптимальной величины (5000 МЕ/мл) обладают более низкими показателями светопоглощения (рис. 10). Показатели экстинкции при концентрации гепарина в растворе ниже 500 МЕ/мл и выше 7000 МЕ/мл соответствуют нулевому значению, т.е., можно предполагать, что взаимодействия между компонентами раствора не происходит (рис. 10).

При исследовании взаимодействия гепарина с различными веществами для доказательства комплексообразования *in vitro* в числе прочих физико-химических методов широко применяют анализ спектров поглощения веществ в УФ области (Ляпина, Аммосова, 1987; Хомутов и др., 2009), поскольку изменения спектров исходных веществ в составе смеси свидетельствуют о

модификации их химической структуры (возможном образовании химических связей, конформационных изменениях молекул и т. п.). Гепарин в фосфатном буфере (рН 7,2) в интервале 200-300 нм имеет максимум поглощения при 210 нм. Некоторые препараты гепарина также имеют слабый максимум в области 260 нм, который, по-видимому, обусловлен примесью белка.

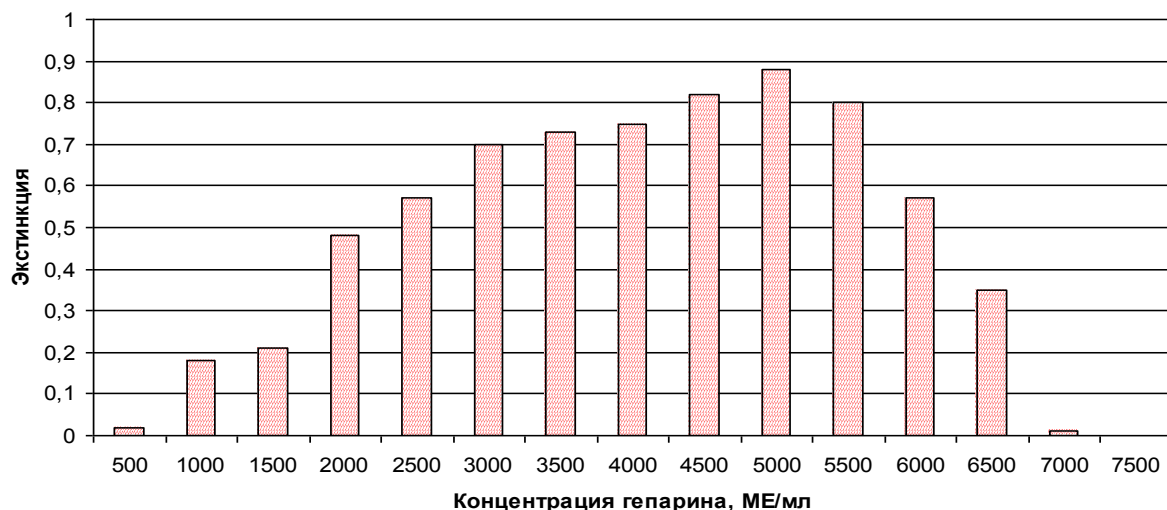


Рис. 10. Диаграмма изменений светопоглощения раствора этанол (1 мл) - гепарин (500-7000 МЕ/мл)

Пчелиный яд, как и большинство веществ белковой природы, имеет два максимума поглощения в области 207-210 и 225 нм, обусловленные вкладом пептидной связи, и слабую полосу поглощения в диапазоне 275-285 нм, характерную для ароматических аминокислот тирозина, фенилаланина и триптофана. Добавление даже небольшого количества гепарина приводит к выраженному изменению спектра поглощения, а именно возрастанию экстинкции во всем исследуемом диапазоне длин волн (200-300 нм) (рис. 11).

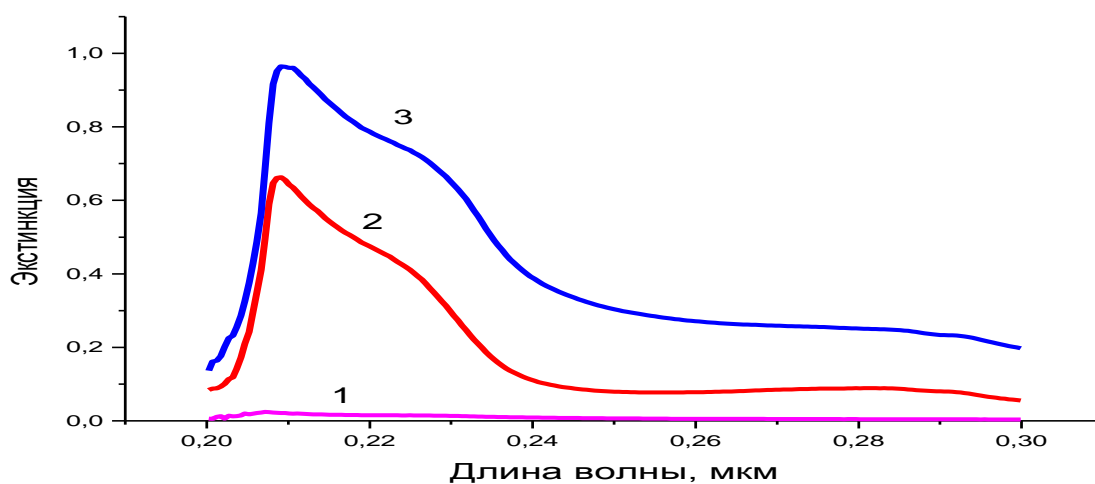


Рис. 11. Спектры поглощения в УФ области гепарина, пчелиного яда и раствора гепарин-яд
1 – гепарин, 1,5 МЕ/мл; 2 – пчелиный яд 0,05 мг/мл; 3 – раствор гепарин-яд

Максимальный спектр поглощения этанола лежит в области 230 нм, гепарина – в области 210 нм, а максимальный спектр поглощения раствора гепарин-этанол в области 270 нм (рис. 12).

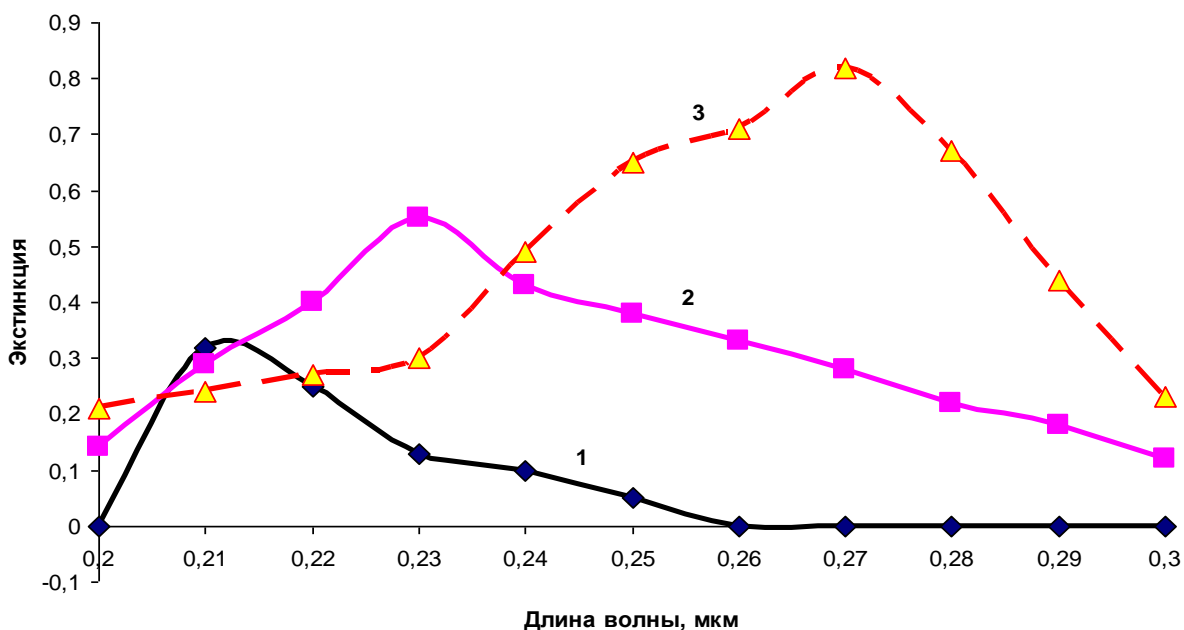


Рис. 12. Спектры поглощения в УФ области гепарина, этанола и раствора гепарин-этанол
1 – гепарин, 5000 МЕ/мл; 2 – этанол 1,0 г/мл; 3 – раствор гепарин-этанол

По-видимому, неспецифическое увеличение оптической активности, также как и образование нефелометрических соединений в смеси пчелиного яда и гепарина можно объяснить укрупнением молекул в растворе при их химическом взаимодействии. Несмотря на то, что пчелиный яд и этанол принадлежат к разным классам химических соединений, имеют разное химическое строение, образуют с гепарином нефелометрические соединения. Кроме того, исследования спектров поглощения в УФ области показывают, что происходит взаимодействие гепарина с пчелиным ядом и этанолом с образованием высокомолекулярных соединений.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов по изучению протекторного действия гепарина при введении пчелиного яда и этанола можно сказать, в основе этого феномена лежит способность гепарина взаимодействовать с исследуемыми веществами, снижая их токсические, кардиотропные, вазотропные, респираторные и ферментные реакции, а также изменяя *in vitro* оптические свойства растворов пчелиный яд-гепарин и этанол-гепарин.

ВЫВОДЫ

1. Гепарин, введенный в виде смеси, до и после введения пчелиного яда и этанола в дозе ДЛ₁₀₀ снижает токсические свойства исследуемых веществ и увеличивает выживаемость экспериментальных животных на 30 – 75%.

Предварительное введение этанола снижает токсические свойства пчелиного яда за счёт стимуляции этанолом поступления эндогенного гепарина в общий кровоток.

2. Продолжительность этанолого сна на фоне введения гепарина в дозе 2500 МЕ/кг снижается с $126,2 \pm 6,7$ мин в контроле до $55,9 \pm 4,6$ мин, а на фоне введения протамин сульфата продолжительность этанолового сна увеличивается до $162,0 \pm 4,8$ мин. Гепарин снижает гиподинамический эффект этанола, а протамин сульфат потенцирует этот эффект.

3. Этанол и пчелиный яд снижают частоту сердечных сокращений, снижают артериальное систолическое и диастолическое давление. Гепарин, введённый совместно в виде смеси яд-гепарин (1:0,5), этанол-гепарин (1000:50), а также предварительное введение гепарина сопровождается снижением кардиотропного и вазотропного действия этанола и пчелиного яда. Предварительное введение протамин сульфата сопровождается потенцированием этих эффектов.

4. Этанол и пчелиный яд увеличивают частоту дыхательных движений. Предварительное введение гепарина, введение гепарина в виде смеси с исследуемыми веществами, инъекция протамин сульфата увеличивают частоту дыхательных движений в 2 – 4 раза относительно исходных величин.

5. Показано, что внутрибрюшинное введение этанола в дозе 4,5 г/кг приводит к повышению активности лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы печени крыс в прямой реакции в субклеточных фракциях. В цитоплазматической фракции активность ферментов в обратной реакции снижается. Предварительное введение животным гепарина в дозе 2500 МЕ/кг частично снимает эффекты внутрибрюшинного введения этанола, что выражается в снижении активности лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы клеток печени крыс в прямой реакции в субклеточных фракциях.

6. Связывание эндогенного гепарина протамин сульфатом и последующее введение этанола приводит к увеличению активности лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в митохондриальной фракции клеток печени крыс. В цитоплазматической фракции активность алкогольдегидрогеназы резко снижается.

7. Введение гепарина в дозе 2500 МЕ/кг при предварительном связывании эндогенного гепарина протамин сульфатом частично снижает токсический эффект внутрибрюшинного введения этанола в дозе 4,5 г/кг, что выражается в возрастании активности исследуемых ферментов в обратной реакции в митохондриальной фракции клеток печени крыс и снижении активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции в цитоплазматической фракции.

8. В исследованиях *in vitro* показано, что оптимальная величина светопоглощения при взаимодействии пчелиного яда и гепарина регистрируется при 30 МЕ/мл гепарина, а для этанола эта величина возрастает до 5000 МЕ/мл. При исследовании спектров поглощения в УФ области показано, что максимальный спектр поглощения этанола лежит в области 230

нм, гепарина – в области 210 нм, а максимальный спектр поглощения раствора гепарин-этанол - в области 270 нм.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Бочкарёва (Смердова) А.В.**, Зимин Ю.В., Хомутов А.Е. Изменение активности лактатдегидрогеназы печени крыс при действии гепарина в условиях *in vitro* // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, 2008. № 5. С. 86-88.

2. Пурсанов К.А., Хомутов А.Е., Слободянюк В.С., **Бочкарёва (Смердова) А.В.** Влияние гепарина на гиподинамию крыс, вызванную этиловым спиртом // Медицинский альманах, 2009. № 1(6). С. 127-128.

3. **Бочкарёва (Смердова) А.В.**, Зимин Ю.В. Изменение активности алкогольдегидрогеназы клеток печени при действии этанола и гепарина // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, 2010. № 2(2). С. 490-494.

Статьи в региональных изданиях и материалах конференций:

4. Хомутов А.Е., Звонкова М.Б., **Бочкарёва (Смердова) А.В.** Деструкция пчелиного яда и комплекса гепарин-яд протеолитическими ферментами *in vitro* // Матер. пятой Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», посвященной 100-летию со дня рождения академика В.Н. Черниговского» (16-19 октября 2007). Санкт-Петербург, 2007. С. 96-97

5. Соловьёва А.Г., Мартусевич А.К., **Бочкарёва (Смердова) А.В.** Роль компьютерных технологий обработки структурно-функциональной информации в энзимокристалломике (на примере термомодификации лактатдегидрогеназы) // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН, 2008. № 3. С. 76-77.

6. **Бочкарёва (Смердова) А.В.**, Зимин Ю.В., Хомутов А.Е. Влияние гепарина на активность лактатдегидрогеназы – одного из важных лабораторных тестов // Физиологические проблемы адаптации: Сборник научных статей. Ставрополь: Изд-во СГУ, 2008. С. 46-48.

7. Звонкова М.Б., **Бочкарёва (Смердова) А.В.**, Хомутов А.Е. Действие протеолитических ферментов на комплекс пчелиный яд-гепарин // Инновации в пчеловодстве. Матер. Международной конференции. Сочи, 11 – 14 октября 2008. С. 273-275

8. Слободянюк В.С., **Бочкарёва (Смердова) А.В.**, Хомутов А.Е. Влияние пчелиного яда и гепарина на активность аминотрансфераз // Матер. XIV Всероссийской конференции «Успехи апитерапии». Рыбное, 28-30 мая 2009. С. 28-33.

9. Yu. V. Zimin, **Bochkareva (Smerdova) A.V.**, A.G. Solovyeva, A.K. Martusevich. Catalytic activity dynamics of lactatedehydrogenase under

thermomodification // Bulletin of International Scientific Surgical Association, 2008. № 1. P. 49-50.

10. **Бочкарёва (Смердова) А.В.** Влияние этанола на изменение активности лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени // Матер. III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». 24-29 мая 2010. Н. Новгород, 2010. С. 121.

11. Хомутов А.Е., Слободянюк В.С., **Бочкарёва (Смердова) А.В.**, Перепелюк З.В. Торможение этанолом гиподинамии крыс, вызванной пчелиным ядом // Матер. Международной конференции «Пчеловодство – XXI век». Москва, 17-20 мая 2010. С. 241-243.