

На правах рукописи

**Слободянюк Владимир Сергеевич**

**ОСОБЕННОСТИ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ  
ГЕПАРИНА НА ЭФФЕКТЫ ПЧЕЛИНОГО ЯДА  
И НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

03.03.01 – физиология

03.01.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой 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 биологических наук  
Малиновская Светлана Львовна

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
Романова Елена Борисовна  
доктор медицинских наук, профессор  
Смирнов Владимир Павлович

**Ведущая организация:** Нижегородский государственный  
педагогический университет

Защита состоится « 22 » декабря 2011 г. в 15 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 «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук, доцент

С.В. Копылова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Проблема регуляции болевой чувствительности является одной из сложнейших для фундаментальной физиологии и чрезвычайно важной для практической медицины. Большое значение придается поискам путей целенаправленного изменения болевых и противоболевых механизмов, что невозможно без углубленного изучения процессов, контролирующих интенсивность реакций организма на болевой стимул (Военнов, Бояринов, 2006; Бакарева и др., 2009; Бабаев и др., 2010). Для решения данной задачи в качестве регуляторов необходимо рассмотреть эндогенные физиологически активные вещества, которые контролируют внутреннюю среду организма, снижая патогенное воздействие экзогенных веществ, используемых для анальгезии, а также, влияют на проявление свойств данных средств. Раскрытие данных механизмов может быть с успехом использовано для разработки новых эффективных и рациональных средств обезболивания (Брагин, 1991; Liang et al., 2008; Gandhi, Mancera, 2009)

По современным представлениям одним из эндогенных регуляторов, способных нивелировать патогенное действие различного рода токсинов, является гепарин. 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 (Кудряшов, 1975; Ляпина и др., 1999). 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, Пурсанов, 2011), а также взаимодействовать с некоторыми фармакологическими веществами (Хомутов и др., 1998; Пурсанов и др., 2009). Исследования последних лет направлены на изучение центрального действия этого биополимера, его влияния на формирование поведения и память (Кондашевская и др., 2000; Никольская, Кондашевская, 2001).

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 и сравнительная характеристика селективного действия экзогенного и эндогенного гепарина на токсические, седа-

тивные, гиподинамические, антиноцицептивные и биохимические показатели пчелиного яда, этанола и фармацевтических препаратов, используемых для наркоза.

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние гепарина на токсическое, седативное, гиподинамическое действие пчелиного яда, этанола, аминазина, димедрола и дроперидола.
2. Исследовать влияние гепарина на антиноцицептивные свойства пчелиного яда, дроперидола, фентанила и аминазана.
3. Провести сравнительный анализ интрафеморального и интрапортального введений пчелиного яда и этанола в условиях гипер- и гипогепаринемии.
4. Провести оценку эффективности внутривенного и внутриартериального введений пчелиного яда и этанола.
5. Исследовать активность аминотрансфераз при действии гепарина, пчелиного яда и этанола, а также их совместного введения.
6. Изучить особенности изменения оптической плотности и спектров поглощения в УФ области смеси гепарина с пчелиным ядом, мелиттином, фосфолипазой А<sub>2</sub>, дроперидолом, фентанилом, оксибутиратом натрия (ГОМК), аминазином, димедролом.

**Научная новизна работы.** Впервые проведена комплексная оценка селективного действия гепарина на токсические, седативные, гиподинамические, антиноцицептивные свойства пчелиного яда и наркотических средств. Установлено, что экзогенный гепарин снижает токсические свойства пчелиного яда, этанола, аминазина, снижает продолжительность сна, вызванного этанолом, аминазином, оксибутиратом натрия, снижает гиподинамическое действие этанола и аминазина, снижает антиноцицептивные свойства пчелиного яда, дроперидола и аминазина. Гепарин не влияет на седативные и анальгетические свойства димедрола и фентанила.

Показано, что токсические свойства пчелиного яда и этанола снижаются при введении в портальную вену по сравнению с внутрифеморальной с инъекцией. Кроме того, внутриартериальное введение пчелиного яда и этанола менее эффективно с точки зрения интоксикации, чем внутривенная инъекция.

Впервые установлено, что экзогенный гепарин в зависимости от дозы разнонаправленно влияет на активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). В дозе 50 МЕ/кг он снижает активность АлАТ и АсАТ, а в высоких дозах (3000 – 5000 МЕ/кг) - достоверно повышает. Пчелиный яд и этанол повышают активность АлАТ и АсАТ в периферической крови крыс. Пчелиный яд на фоне действия гепарина потенцирует активность АлАТ и АсАТ. Этанол в зависимости от дозы и способа введения с гепарином увеличивает или уменьшает активность АлАТ и АсАТ относительно контрольных величин.

Впервые *in vitro*, с помощью методов фотоэлектроколориметрии и регистрации спектров поглощения в УФ области, установлено, что пчелиный яд, мелиттин, этанол, дроперидол, оксибутират натрия, аминазин взаимодей-

ствуют с гепарином в стехиометрических весовых соотношениях, индивидуальных для каждого из исследуемых веществ. Фентанил, димедрол и фосфолипаза  $A_2$  с гепарином не взаимодействуют.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные о модифицирующем действии гепарина на эффекты пчелиного яда и наркотических средств в значительной мере расширяют представления о роли эндогенного гепарина в реализации детоксицирующей функции организма.

Фундаментальное значение для понимания процессов гомеостаза имеют исследования эндогенных регуляторов, к которым относится гепарин, обладающих возможностями взаимодействия с широким кругом как метаболических, так и экзогенных соединений.

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и используются при чтении спецкурса «Неспецифическая регуляция функций»

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Гепарин снижает токсические, седативные, гиподинамические и антиноцицептивные свойства пчелиного яда, этанола, аминазина, оксибутирата натрия, дроперидола. Гепарин не влияет на седативные и анальгетические свойства димедрола и фентанила.

2. Протамин сульфат потенцирует токсические, седативные, гиподинамические и антиноцицептивные свойства пчелиного яда, этанола, аминазина, оксибутирата натрия, дроперидола. Протамин сульфат не влияет на седативные и анальгетические свойства димедрола и фентанила.

3. Интрапортальное и внутриаортальное введение пчелиного яда и этанола менее эффективно, чем интрафеморальное введение.

4. Гепарин в низких дозах (50 МЕ/кг) снижает активность АлАТ и АсАТ, а в высоких дозах понижает активность АлАТ и АсАТ. Пчелиный яд и этанол на фоне действия гепарина в зависимости от дозы и способа введения увеличивают или уменьшают активность АлАТ и АсАТ.

5. Гепарин изменяет оптическую плотность и спектры поглощения в УФ области растворов пчелиного яда, мелиттина, этанола, аминазина, дроперидола, оксибутирата натрия. Гепарин не влияет на оптическую плотность и спектры поглощения в УФ области растворов фосфолипазы  $A_2$ , димедрола и фентанила.

**Апробация работы.** Основные положения работы были доложены и обсуждены: на научно-производственной конференции «Апитерапия сегодня» (Рыбное, 2006), на XIV Всероссийской конференции «Успехи апитерапии» (Рыбное 2009), на III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» (Н. Новгород, 2010), на Международной конференции «Пчеловодство – XXI век» (Москва, 2010), на 16 Всероссийской конференции «Успехи апитерапии» (Ярославль, 2011). По материалам диссертации опубликовано 12 научных статей, 6 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 169 страницах и состоит из введения, 2 глав обзора литературы, материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, выводов, библиографического указателя, приложения. Список цитируемой литературы содержит 272 источника, из которых 132 на русском и 140 на иностранных языках. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 41 рисунком.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Эксперименты были проведены на 380 белых лабораторных нелинейных крысах-самцах массой 180 – 200 г и 180 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) 1% раствор протамин сульфата; 3) нативный пчелиный яд; 4) 30% раствор этанола; 5) дроперидол, содержащий в 1 мл раствора 2,5 мг сухого вещества; 6) фентанил, содержащий в 1 мл раствора 0,05 мг сухого вещества; 7) натрия оксибутират (ГОМК), содержащий в 1 мл раствора 200 мг сухого вещества; 8) аминазин, содержащий в 1 мл раствора 25 мг сухого вещества.

Определение токсичности исследуемых веществ производилось на белых мышах весом 18-23 г. Исследуемые вещества разводились в изотоническом растворе хлорида натрия и вводились животным внутрибрюшинно в возрастающих количествах. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке методом пробит-анализа Миллера и Тейтнера (Беленький, 1963).

При изучении седативных свойств этанола, аминазина и оксибутирата натрия, введенных внутрибрюшинно, у крыс регистрировался наркотический сон (Lheureux et al., 1993), продолжительность которого способна меняться при введении различных веществ (Буров, Ведерникова, 1985; Сатановская, 1990). Изучение гиподинамии, вызванной нейролептическим действием дроперидола и этанола, проводилось на тредбане.

Ноцицептивные реакции оценивали по двум стандартным тестам, позволяющим до определенной степени судить о характере влияния веществ преимущественно на спинальном (тест отведения хвоста – «tail flick») и супраспинальном уровнях (тест «горячей пластины» - «hot plate»). Опыты проводили на животных, прошедших фоновое тестирование, исходные ноцицептивные пороги (фон) которых в тесте I – не превышал 8 с, в тесте II – 15 с. (Гацура, 1974).

Сравнительная оценка интрапортального и интрафеморального способа введения производилась на крысах под лёгким эфирным наркозом. Животные фиксировались на операционном столике в положении на спине. Одной группе крыс вводили исследуемые вещества в бедренную вену, другой - в воротную вену. Тестовую дозу яда, соответствующую примерно 0.2-0.3 ДЛ<sub>50</sub>, вводили каждые 10 минут, оценивая суммарную дозу, вызвавшую гибель животного. Определение уровня свободного гепарина в периферической кро-

ви производилось микрометодом по Сирмаи (Сирмаи, 1957). Активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы определяли стандартными методами. Взаимодействие гепарина с исследуемыми веществами *in vitro* изучали фотокolorиметрическим 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 в УФ- области проводили на установке, функционально идентичной однолучевому спектрофотометру.

Статистическая обработка экспериментальных данных была выполнена с помощью программы «Биостат». Для сравнения нескольких групп использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий Стьюдента для множественных сравнений (Гланц, 1999).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Модификация гепарином токсического и седативного действия пчелиного яда и наркотических средств

**1.1. Влияние гепарина на токсическое действие пчелиного яда и наркотических средств.** 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 2:1  $ДЛ_{50}$  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 (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние экзогенного и эндогенного гепарина на токсические свойства пчелиного яда

№ п/п	Условия эксперимента	Доза яда, мг/кг
1.	$ДЛ_{50}$ пчелиный яд	$7.0 \pm 0.3$
2.	$ДЛ_{50}$ смеси яд-гепарин (1:0.5)	$17.4 \pm 1.8^*$
3.	$ДЛ_{100}$ пчелиного яда	15.0
4.	$ДЛ_{100}$ смеси яд-гепарин (1:0.5)	$25.0 \pm 3.4^*$
5.	$ДЛ_{50}$ пчелиного яда на фоне протамин сульфата (10 мг/кг)	$5.1 \pm 0.1^*$

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

Доза яда, вызывающая в эксперименте гибель всех крыс ( $ДЛ_{100}$ ), равнялась 15.0 мг/кг. При добавлении к пчелиному яду гепарина в соотношении яд-гепарин 2:1  $ДЛ_{100}$  возрастала до  $25 \pm 3.4$  мг/кг. Блокирование эндогенного гепарина его антагонистом протамин сульфатом вызывало заметное увеличение токсичности пчелиного яда,  $ДЛ_{50}$  в этом случае составила  $5.1 \pm 0.1$  мг/кг (табл. 1).

При внутрибрюшинном введении этанола в дозе  $8.1 \pm 0.5$  г/кг ( $ДЛ_{50}$ ) в течение суток 50% крыс погибали (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние экзогенного и эндогенного гепарина на токсические свойства этанола

№ п/п	Условия эксперимента	Доза, мг/кг
1.	ДЛ <sub>50</sub> этанола	8.1±0.5
2.	ДЛ <sub>50</sub> смеси этанол-гепарин (1000:50)	15.5±2.7*
3.	ДЛ <sub>100</sub> этанола	16.0
4.	ДЛ <sub>100</sub> смеси этанол-гепарин (1000:50)	22.0±3.4*
5.	ДЛ <sub>50</sub> пчелиного яда на фоне протамин сульфата (10 мг/кг)	4.8±0.6*

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

При введении смеси этанол-гепарин в соотношении 20:1 ДЛ<sub>50</sub> увеличилась до 15.5±2.7 г/кг. Введение этанола в дозе 16.0 мг/кг (ДЛ<sub>100</sub>) сопровождалось гибелью всех крыс в течение суток. Инъекция смеси этанол-гепарин в соотношении 20:1 сопровождалась увеличением ДЛ<sub>100</sub> до 22.0±3.4 г/кг. Предварительное введение протамин сульфата в дозе 10 мг/кг в значительной степени увеличивало токсичность этанола, и в этом случае ДЛ<sub>50</sub> соответствовала 4.8±0.6 г/кг, что достоверно отличалось от контрольной величины (табл. 2).

Исследование токсического действия аминазина показало, что ДЛ<sub>50</sub> при внутрибрюшинном введении крысам составляет 208±16.2 мг/кг. Инъекция смеси аминазин-гепарин в весовом соотношении 2:1 сопровождалась достоверным увеличением ДЛ<sub>50</sub> до 333±23.1 мг/кг. При предварительном введении гепарина в дозе 5000 МЕ/кг с последующей инъекцией аминазина величина ДЛ<sub>50</sub> возрастала относительно контрольных величин и достигала 291±12.9 мг/кг. Значительное снижение ДЛ<sub>50</sub> аминазина регистрируется при предварительном введении протамин сульфата, что связано с блокадой эндогенного гепарина (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние экзогенного и эндогенного гепарина на токсические свойства аминазина

№ п/п	Условия эксперимента	ДЛ <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Аминазин	208±16.2
2.	Смесь аминазин-гепарин (100:50)	333±23.1*
3.	Аминазин на фоне гепарина (5000 МЕ/кг)	291±12.9*
4.	Гепарин (5000 МЕ/кг) на фоне аминазина	212±14.4
5.	Аминазин на фоне протамин сульфата (10мг/кг)	154±18.5*

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

В отличие от пчелиного яда, этанола и аминазина, ни экзогенный, ни эндогенный гепарин не изменяет ДЛ<sub>50</sub> димедрола, величина которой колеблется в пределах от 96±5.7 до 108±6.5 мг/кг (табл. 4).



Таблица 4.

Влияние экзогенного и эндогенного гепарина на токсические свойства димедрола

№ п/п	Условия эксперимента	ДЛ <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Димедрол	100±8.4
2.	Смесь димедрол-гепарин (100:50)	108±6.5
3.	Димедрол на фоне гепарина (5000 МЕ/кг)	104±3.2
4.	Гепарин (5000 МЕ/кг) на фоне димидрола	102±9.4
5.	Димедрол на фоне протамина сульфата (10мг/кг)	96±5.7

Интересные данные были получены в серии экспериментов, в которых 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.

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. 5).

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. 5).

Таблица 5

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 ( $p \leq 0,05$ )

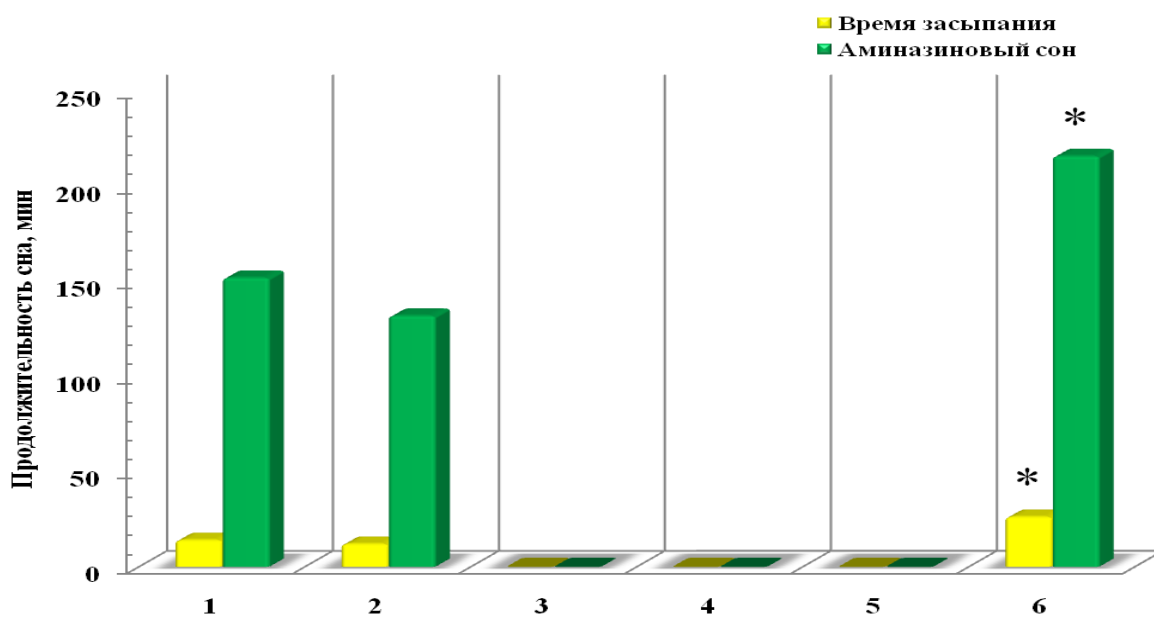
При введении пчелиного яда на фоне этанола уровень свободного гепарина в периферической крови также повышается с последующим медленным

понижением показателей и к 40-й мин после инъекции более чем в 6 раз превышает исходные величины (табл. 5).

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. 5).

**1.2. Влияние гепарина на продолжительность наркотического сна.** 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, а время засыпания -  $4.2 \pm 0.3$  мин. Предварительное введение гепарина в дозе 2500 и 5000 МЕ/кг с последующей инъекцией этанола в дозе 5 г/кг снижало продолжительность сна до  $52.9 \pm 2.2$  и  $55.9 \pm 4.6$  мин соответственно. В этих условиях опыта время засыпания увеличивается до 10 – 12 мин. Протамина сульфат в дозе 10 мг/кг достоверно увеличивает продолжительность этанолового сна до  $162.0 \pm 4.8$  мин (в контроле -  $126.2 \pm 6.7$  мин), соответственно время засыпания снижалось до  $2.4 \pm 0.1$  мин.

При внутрибрюшинном введении амиазиана в дозе 100 мг/кг продолжительность сна соответствует  $152 \pm 33.5$  мин, а время засыпания -  $14 \pm 3,2$  мин. Эти данные нами были приняты за контрольные величины (рис. 1).



**Рис. 1. Влияние экзогенного и эндогенного гепарина на продолжительность амиазинового сна**

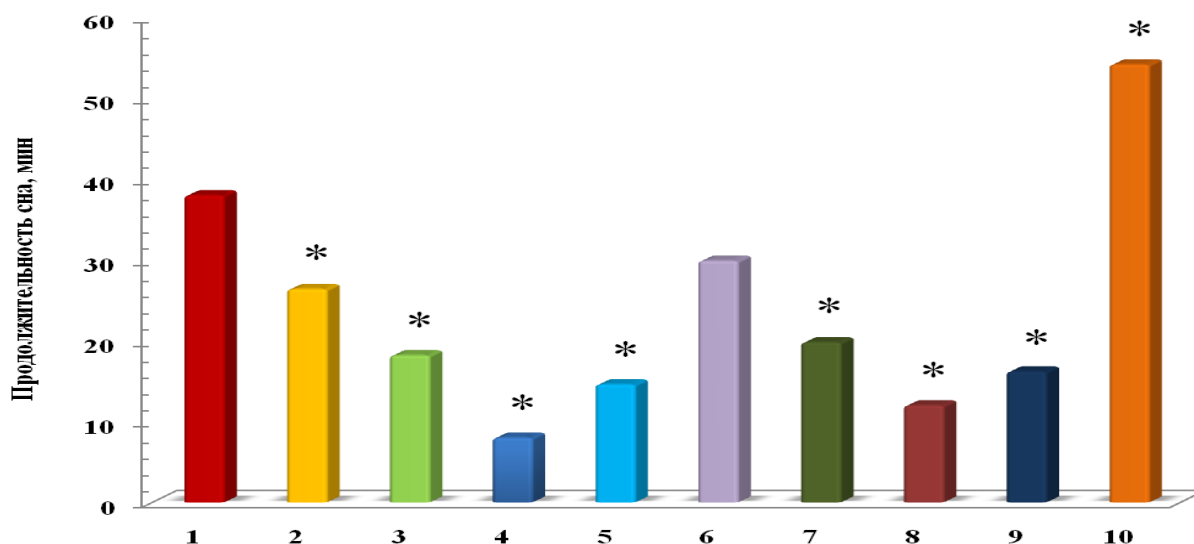
- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1-Амиазин (100 мг/кг);          | 2-Гепарин (500 МЕ/кг)→амиазин;  |
| 3-Гепарин (2500 МЕ/кг)→амиазин; | 4-Гепарин (2500 МЕ/кг)+амиазин; |
| 5-Гепарин (5000 МЕ/кг)→амиазин; | 6-Протамина (10 мг/кг)→амиазин. |
- 0 – сон отсутствует в течение 5 часов

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

При предварительном введении гепарина в дозе 500 МЕ/кг с последующей инъекцией амиазиана в дозе 100 мг/кг продолжительность наркотиче-

ского сна недостоверно снижается до  $132 \pm 34.1$  мин, а время засыпания -  $12 \pm 4,1$  мин. Совместное применение гепарина и аминазина в виде инкубированной смеси в течение 15 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$  сопровождалось полным отсутствием наркотического сна в течение 5 часов. Предварительное введение гепарина в дозах 2500 и 5000 МЕ/кг также сопровождалось отсутствием сна. Таким образом, гепарин в определённых дозах полностью снимает седативный эффект аминазина. Иная картина наблюдается при предварительном введении протамин сульфата в дозе 10 мг/кг. Продолжительность аминазинового сна резко увеличивается, достигая  $216 \pm 24.2$  мин, а время засыпания достоверно снижается относительно контрольных величин и соответствует  $6.2 \pm 2.8$  мин (рис. 1).

При внутривенном введении оксибутирата натрия, который является агонистом гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), в дозе 100 мг/кг продолжительность наркотического сна соответствовала  $38.0 \pm 2.3$  мин. В связи с тем, что в этой серии опытов продолжительность сна была небольшой, время засыпания не регистрировалось (рис. 2).



**Рис. 2. Продолжительность сна при введении оксибутирата натрия (ГОМК) в смеси и на фоне гепарина и протамин сульфата**

- |                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 1- Оксибутират натрия (100 мг/кг) | 6. Гепарин (5 МЕ/кг) → ГОМК    |
| 2- Гепарин+ГОМК (0.01:20)         | 7. Гепарин (50 МЕ/кг) → ГОМК   |
| 3- Гепарин+ГОМК (0.1:20)          | 8. Гепарин (500 МЕ/кг) → ГОМК  |
| 4- Гепарин+ГОМК (1:20)            | 9. Гепарин (5000 МЕ/кг) → ГОМК |
| 5- Гепарин+ГОМК (10:20)           | 10. Протамин (10 мг/кг) → ГОМК |

\* - Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ( $p \leq 0.05$ )

Инъекция смеси гепарин-ГОМК в соотношении 0.01:20, 0,1:20 и 1:20 сопровождалась постепенным снижением продолжительности сна в зависимости от концентрации гепарина, входящего в состав смеси, и равнялась  $26.4 \pm 1.8$  мин,  $18.2 \pm 2.1$  мин и  $8.0 \pm 0.9$  мин соответственно. Таким образом, максимальным протекторным действием обладает соотношение гепарина к ГОМК 1:20. Повышение концентрации гепарина в 10 раз от оптимальной ве-

личины (10:20) сопровождается увеличением продолжительности сна до  $14.6 \pm 1.6$  мин (рис. 2). В следующей серии опытов схема эксперимента была видоизменена: гепарин вводили не в смеси с ГОМК, а предварительно с последующей инъекцией ГОМК в тестовой дозе. Оказалось, что в этом случае максимальный протекторный эффект наблюдается при предварительном введении гепарина в дозе 500 МЕ/кг, а продолжительность сна соответствует  $12.0 \pm 1.8$  мин. Как и в предыдущих сериях экспериментов, предварительное введение протамина сульфата в дозе 10 мг/кг значительно увеличивает продолжительность наркотического сна, вызванного ГОМК (рис.2).

**1.3. Влияние гепарина на гиподинамические эффекты этанола и дроперидола.** При внутрибрюшинном введении этанола в дозе 2 г/кг уже через 10 мин от момента введения наблюдается гиподинамический эффект, а величина падений с тредбана соответствует  $3,3 \pm 0,3$  раз/мин. Максимальный гиподинамический эффект наблюдался через 20 мин от момента инъекции этанола и соответствовал  $4,1 \pm 0,5$  раз/мин. К концу наблюдения отмечалось частичное восстановление двигательной активности и количество падений с тредбана снижалось до  $1,6 \pm 0,6$  раз/мин. Введение гепарина в виде смеси, в которой концентрация этанола соответствовала 2 г/кг и являлась константной величиной, а количество гепарина соответствовало дозам 25 и 250 МЕ/кг, не отличалось достоверно от серии, в которой вводили только этанол. Увеличение концентрации гепарина в смеси в 10 раз, также как и предварительное введение гепарина в дозе 2500 МЕ/кг практически полностью снимало гиподинамический эффект этанола. При сочетанном применении этанола в смеси с гепарином, где концентрация гепарина в смеси соответствовала дозе 5000 МЕ/кг незначительно снижала гиподинамический эффект этанола. В то же время предварительное введение протамина сульфата потенцировало гиподинамическое действие этанола и в этом случае количество падений с тредбана значительно увеличивалось.

При внутримышечном введении дроперидола в дозе 5 мг/кг максимальный гиподинамический эффект регистрируется через 20 мин после инъекции. В этом случае количество падений с тредбана соответствует  $4.1 \pm 0.5$  раз/мин. Максимальным антигиподинамическим эффектом обладает смесь дроперидол-гепарин в соотношении 1:5. При таком соотношении компонентов количественные показатели падений крыс с тредбана не отличаются от контрольных величин. Аналогичная картина наблюдается при предварительном введении гепарина в дозе 500 МЕ/кг, с последующей инъекцией тестовой дозы дроперидола. Предварительное введение протамина сульфата в дозе 10 мг/кг резко усиливает гиподинамический эффект дроперидола, который является более продолжительным, а показатель гиподинамии соответствует через 40 мин после инъекции дроперидола  $7.9 \pm 0.4$  раз/мин.

Таким образом, гепарин модифицирует токсическое действие пчелиного яда, этанола, аминазина, но не действует на токсические свойства димедрола. Гепарин снижает продолжительность наркотического сна, вызванного этанолом, аминазином и оксибутиратом натрия (ГОМК). Гепарин модифицирует гиподинамический эффект этанола и дроперидола.

## 2. Влияние гепарина на антиноцицептивные свойства пчелиного яда и наркотических средств

**2.1. Пчелиный яд.** Известно, что пчелиный яд способен оказывать антиноцицептивное действие при однократном введении (Шилова, Парин, 1995), при этом происходит активация апитоксином эндогенной опиоидной системы (Парин, Голанов, 1983). Очевидно, этот феномен следует рассматривать в связи с установленным фактом блокирования пчелиным ядом простагландинсинтетазной активности (Shkenderov et al., 1979), так как способность опиоидов угнетать синтез простагландинов хорошо известна.

Для нас представлял интерес вопрос о модулирующем влиянии гепарина на антиноцицептивное действие пчелиного яда, реализующееся на супрасегментарном уровне. С этой целью тестировали животных по тесту «горячей пластины» при болюсном введении пчелиного яда, на фоне гепарина, а также инкубированной смеси апитоксин:гепарин (1:0,5).

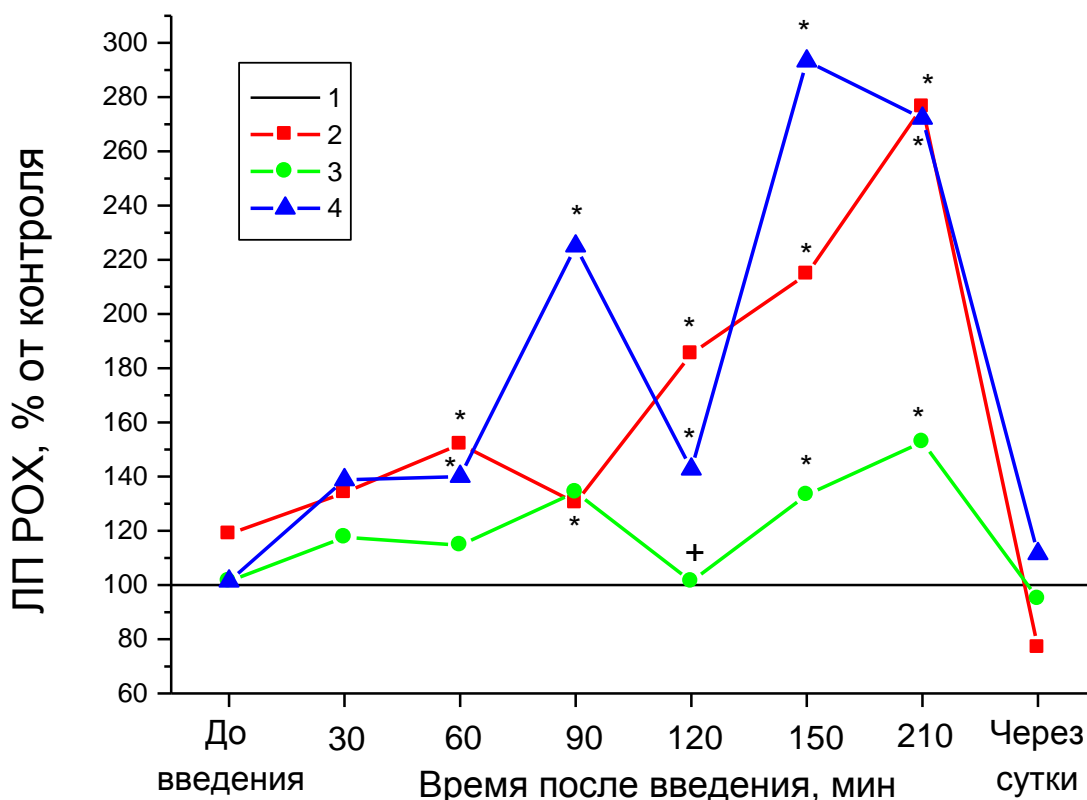
При внутривентральном введении пчелиного яда в дозе 1 мг/кг достоверное увеличение латентного периода реакции облизывания лап (ЛП РОЛ) произошло на 90, 120 и 150 мин, на фоне гепарина (500 МЕ/кг) снижение порога боли отмечалось с 60 по 150 мин. Введение смеси пчелиного яда с гепарином (1:0,5) привело к анальгезии на 120 и 150 мин.

**2.2. Дроперидол.** В первой серии опытов исследовали модулирующее влияние гепарина (500 МЕ/кг) на антиноцицептивное действие дроперидола (5 мг/кг) с помощью теста реакции отведения хвоста. Введение дроперидола приводит к постепенному увеличению латентных периодов, начиная с 60 минуты опыта, что свидетельствует о развитии анальгезии (рис. 3).

Динамика изменения ЛП РОХ при последовательном введении дроперидола и гепарина, также как и при применении инкубированной смеси дроперидола и гепарина (1:5) носит периодический характер. Связанный с дроперидолом гепарин, также как и гепарин, введенный через 10 минут после дроперидола, оказывает незначительное влияние на уменьшение антиноцицептивного действия дроперидола. В комплексе гепарин задерживал развитие дроперидолвызванной анальгезии. Наиболее выраженный эффект отмены действия дроперидола наблюдали при предварительном (за 10 минут) введении гепарина, когда действие нейролептика на фоне гепарина было отсрочено на 1,5 часа. Динамика изменений длительности латентных периодов при введении дроперидола на фоне протамин сульфата (10 мг/кг), указывает на незначительную роль эндогенного гепарина в модуляции эффекта дроперидола при тестировании болевой чувствительности с помощью теста реакции отведения хвоста.

Изменение тонуса различных нейрхимических систем, принимающих участие в обезболивании, можно вызвать с помощью модуляции активности их рецепторных механизмов. В связи с этим представляет особый интерес рассмотрение результатов экспериментов с участием фармакологических соединений, изменяющих активность рецепторов, а именно, с применением не-селективного блокатора опиоидных рецепторов – налоксона, так как, общепринято, что эндогенной опиоидной системе отводится лидирующая роль в

контроле боли, а также неселективного блокатора  $\beta$ -адренергических рецепторов – обзидана (пропранолола), так как данные рецепторы принимают непосредственное участие в реализации большинства адаптивных реакций, в том числе, предполагается, и в регуляции болевой чувствительности при различных видах воздействий (Брагин, 1991).



**Рис. 3. Влияние дроперидола и гепарина на реакцию отведения хвоста у крыс.**

1 – контроль; 2 – дроперидол (5 мг/кг);  
3 – гепарин → дроперидол; 4 – дроперидол → гепарин.

\* –  $p < 0.05$  сравнение с контролем; + –  $p < 0.05$  сравнение с дроперидолом.

Значения ЛП РОХ в группах «наллоксон, дроперидол, гепарин» и «наллоксон, гепарин, дроперидол» были на 100-150% достоверно выше ( $p < 0,05$ ) контрольных и исходных, начиная с 60 минуты и в течение последующих 150 мин эксперимента. Статистически значимые различия между группой без применения гепарина и группами, в которых на фоне наллоксона дроперидол вводился вместе с мукополисахаридом в разных вариантах, были зарегистрированы на 60, 90, 120 и 210 минуте опыта. Таким образом, при блокировании опиоидных рецепторов гепарин либо оказывает влияние на опиоидные рецепторы, либо способствует проявлению анальгетической активности дроперидола через иные механизмы.

Одними из наиболее важных в регуляции многих функций организма являются  $\beta$ -адренергические рецепторы. Вклад данной системы в антиноцицептивные процессы, происходящие на спинальном уровне при применении

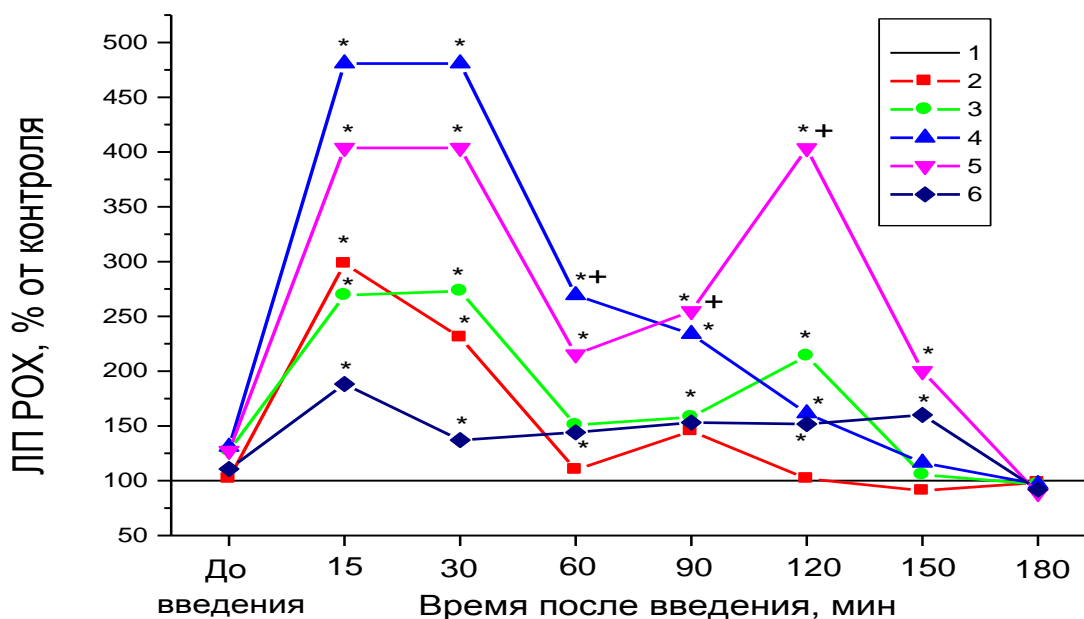
дроперидола и гепарина, оценивали с помощью использования блокатора  $\beta$ -адренергических рецепторов обзидана, вводимого внутривенно в дозе 1 мг/кг. Торможение активности  $\beta$ -адренергических рецепторов вызывает частичное подавление противоболевого действия дроперидола, достоверное отличие от контроля ( $p < 0,05$ ) получили только на 120 и 150 мин опыта. Причем, динамика изменений латентных периодов РОХ при введении обзидана после дроперидола и гепарина мало отличалась от таковой в опыте с дроперидолом и гепарином, анальгетическая активность была достоверно снижена на 90 и 120 мин опыта. Предварительное применение обзидана до введения дроперидола и гепарина (3-я группа) дало неожиданную реакцию нарушения двигательной функции задних конечностей у животных, которая не наблюдалась в других группах и продолжалась в течение 1,5 часов и отразилась на длительности латентных периодов. Т.е., наиболее выраженный нейролептический эффект дроперидола при сочетании с гепарином получили при предварительной блокаде  $\beta$ -адренергической системы. Возможно, именно влияние гепарина на  $\beta$ -адренергическую систему играет ключевую роль в подавлении антиноцицептивной активности дроперидола при предварительном введении гепарина.

В следующем блоке экспериментов при анализе влияние тех же веществ (дроперидола, гепарина, налоксона обзидана, протамин сульфата) был применен другой способ тестирования – болевую чувствительность оценивали по латентным периодам реакции облизывания лап. При этом из всего набора применяемых нами сочетаний препаратов статистически значимых межгрупповых различий установлено не было, а увеличение длительности ЛП РОЛ произошло на 30 мин только в группе при введении дроперидола на фоне антагониста гепарина – протамин сульфата.

Вероятнее всего данный прирост был вызван стресс-реакцией на введение фармакологических агентов, на это указывает также пикообразный характер динамики изменений ЛП РОЛ с последующим резким сокращением. Возможно, эндогенный гепарин выполняет в организме отчасти стресслимитирующую функцию, и блокада центральных дофаминовых путей дроперидолом на фоне гипогепаринемии протамин сульфатом только усиливает эту стресс реакцию на болевой термический стимул, на участие ДА-механизмов указывает и повышение болевой чувствительности по сравнению с исходным уровнем на 35% в группе с дроперидолом на 60 мин. С этой точки зрения, можно рассматривать стабилизирующие эффекты гепарина и налоксона в сочетании с дроперидолом, в данных группах значения ЛП РОЛ были близки к контрольным и исходным.

Отличие результатов полученных разными способами анальгезиометрии указывает на различия в характере воздействия дроперидола и гепарина, оказываемое на спинальном и супраспинальном уровнях.

**2.3. Фентанил.** Целью данной части нашей работы было определение степени влияния гепарина на анальгезию, вызванную фентанилом. Предварительно была подобрана доза анальгетика (0,08 мг/кг), при которой развивался непродолжительный минимальный обезболивающий эффект (рис. 4).



**Рис. 4. Влияние фентанила и гепарина на реакцию отведения хвоста у крыс.**

- 1 – контроль; 2–фентанил (0.08 мг/кг);  
 3–гепарин (50 МЕ/кг)→фентанил; 4–гепарин (500 МЕ/кг)→фентанил;  
 5–гепарин (5000 МЕ/кг)→фентанил; 6 – фентанил + гепарин (1:50).  
 \* –  $p < 0.05$  сравнение с контролем; + –  $p < 0.05$  сравнение с фентанилом.

При тестировании по реакции отведения хвоста значения латентных периодов достоверно превышали контрольные и исходные показатели в среднем на 150% через 15 и 30 минут после внутрибрюшинного введения фентанила (рис. 4), затем наблюдали резкий спад анальгезии, и в течение последующего времени, до 180 мин опыта, уровень болевой чувствительности восстанавливался до первоначального. На фоне гепарина, который вводили за 10 мин до фентанила в дозах 50, 500 и 5000 МЕ/кг, а также инкубированной смеси фентанила и гепарина в соотношении 1:50, восстановление порога болевой чувствительности происходило значительно дольше.

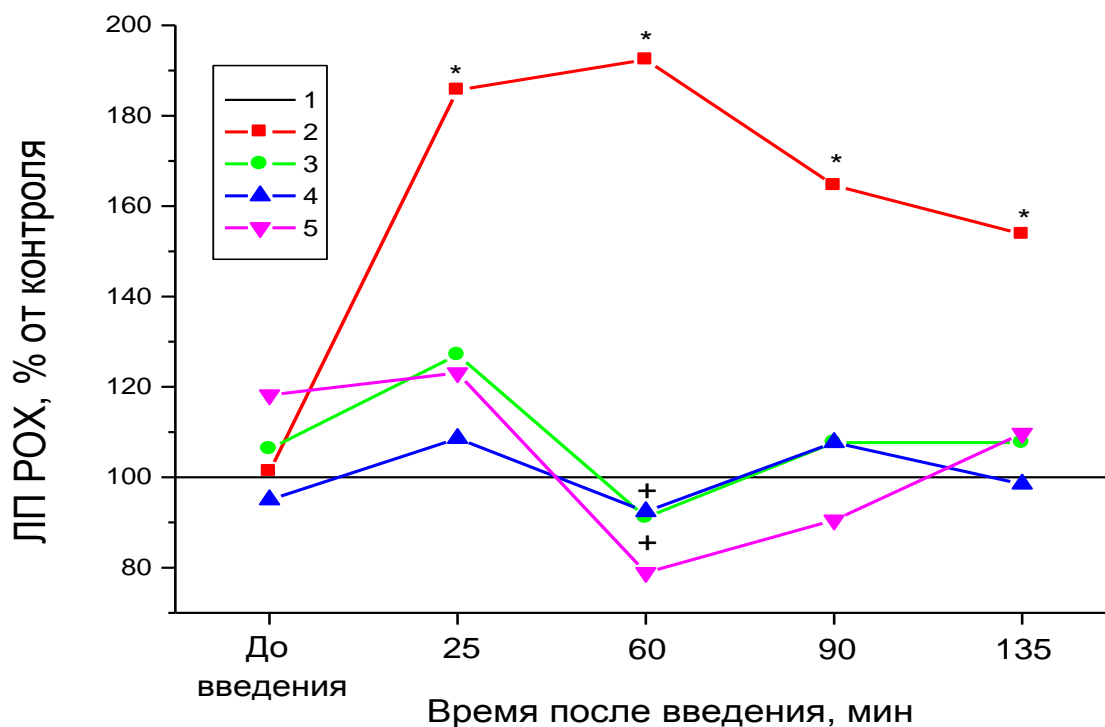
Таким образом, очевидным является факт положительного взаимодействия гепарина с фентанилом, которое в данных условиях способствовало пролонгации действия опиоидного анальгетика.

**2.4. Аминазин.** При исследовании влияния гепарина (500 МЕ/кг) на свойства аминазина использовали тест отведения хвоста. Введение аминазина, в дозе, близкой к терапевтической – 1,25 мг/кг, вызывало у животных гиподинамию, гипотермию, значительное увеличение ЛП РОХ, начиная с 25 мин, в результате седативной реакции время эксперимента было ограничено до 135 мин. (рис. 5).

Данное действие аминазина полностью снималось предварительным введением гепарина (500 МЕ/кг), либо протамин сульфатом (10 мг/кг), достоверное отличие от группы с аминазином отмечено на 60 мин опыта. Отсут-



ствии эффекта аминазина наблюдалось и при введении инкубированной смеси.



**Рис. 5. Влияние аминазина, гепарина и протамин сульфата на реакцию отведения хвоста у крыс.**

- 1 – контроль; 2 – аминазин (1.25 мг/кг);  
 3 – гепарин → аминазин; 4 – протамин → аминазин;  
 5 – аминазин + гепарин (1 : 0.5);

\* –  $p < 0.05$  сравнение с контролем; + –  $p < 0.05$  сравнение с аминазином.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в данном случае блокирование действия аминазином и протамин сульфатом, возможно, произошло вследствие образования неактивного комплекса аминазина с полианионами.

### **3. Роль гепарина печени и сосудистого русла в реализации антидотного действия при введении пчелиного яда и этанола**

**3.1. Сравнение кардиотоксического действия пчелиного яда и этанола при введении в бедренную и воротную вены.** Для оценки защитной роли печени в процессе интоксикации пчелиным ядом и этанолом была изучена их сравнительная активность при разных способах попадания в организм – через бедренную или воротную вены. Тестовую дозу исследуемых веществ вводили каждые 10 минут, оценивали их суммарную дозу, вызвавшую гибель животного.

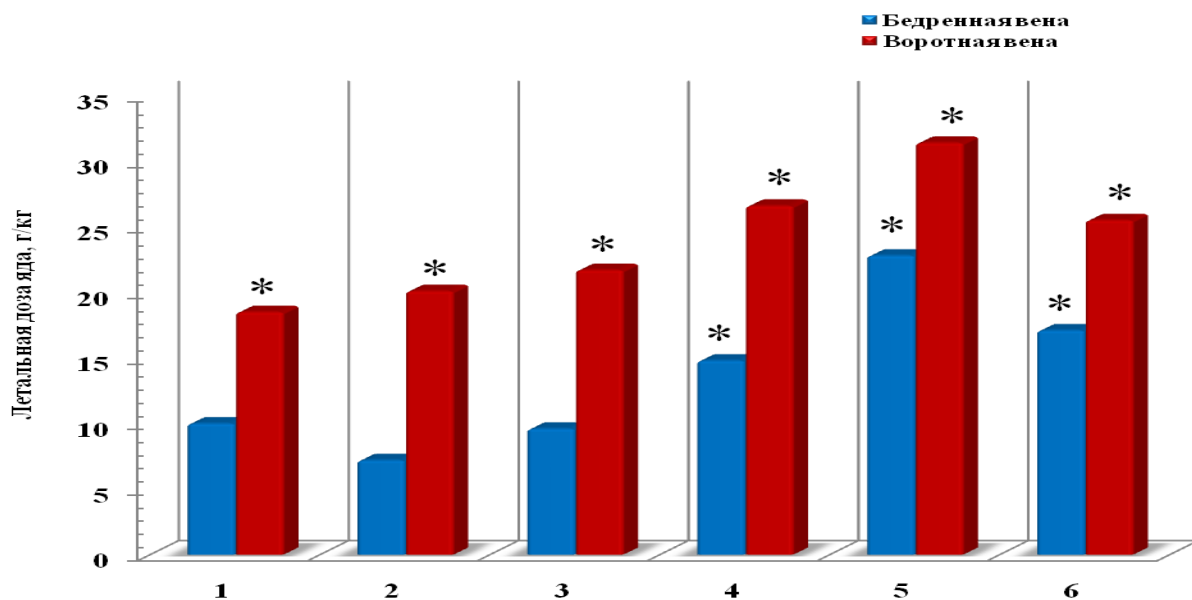
Инъекция крысам пчелиного яда в дозе 2 мг/кг в бедренную вену вызывала резкие нарушения сердечной деятельности уже в первые минуты после интоксикации. У большинства животных наблюдалось выраженное уменьшение

частоты сердечных сокращений (ЧСС) через 30 секунд. Как было показано и в работе В. Н. Крылова (1995), наряду с развитием синусовой брадикардии, на ЭКГ наблюдалось извращение желудочкового комплекса, возникновение «гигантского» зубца Т, снижение других зубцов, характерное для терминального состояния деятельности сердца. Гибель животного наступала в некоторых случаях через 5 минут после первого введения тестовой дозы яда. Средняя летальная доза составила  $3.33 \pm 0.67$  мг/кг. При введении того же количества пчелиного яда в воротную вену наблюдали небольшое снижение ЧСС в первые 5 минут после инъекции с последующим восстановлением или незначительным ускорением сердечного ритма. Терминальное состояние сердечной мышцы наступало только при инъекции 6–9 тестовых доз, средняя летальная доза составила  $14.3 \pm 0.95$  мг/кг.

При дробном введении этанола в бедренную вену летальная доза яда соответствует  $10.3 \pm 0.94$  г/кг, в то время как при тех же условиях эксперимента введение в воротную вену печени сопровождается увеличением летальной дозы до  $18.5 \pm 1.17$  г/кг (рис. 6).

Инфузия гепарина в дозе 500 и 5000 МЕ/кг как в бедренную, так и в воротную вену сопровождается увеличением летальной дозы этанола, хотя разница между введениями в бедренную и воротную вены также сохраняется (рис. 6).

Дальнейшее увеличение дозы предварительно инъецированного гепарина до 7000 МЕ/кг сопровождается снижением величины летальной дозы относительно экспериментов, в которых гепарин вводился в дозе 5000 МЕ/кг (рис. 6).



**Рис. 6. Сравнительная оценка летальной дозы этанола при введении в бедренную и воротную вены в условиях гипергепаринемии**

- |                                   |                                  |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1- Этанол;                        | 2- Гепарин (5 МЕ/кг) → этанол;   |
| 3- Гепарин (50 МЕ/кг) → этанол;   | 4- Гепарин (500 МЕ/кг) → этанол; |
| 5- Гепарин (5000 МЕ/кг) → этанол; | 6- Гепарин (7000 МЕ/кг) → этанол |

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

Таким образом, при предварительном введении гепарина как в бедренную, так и в воротную вены существует определённый оптимум, выше и ниже которого антидотные свойства гепарина при инфузии этанола снижаются.

Ранее было установлено, что протамина сульфат в дозе 10 мг/кг блокирует эндогенный гепарин в течение 6 часов (Пахомова, Хомутов, 2001). Предварительное введение протамина сульфата в указанной дозе в бедренную и воротную вены с последующей инфузией пчелиного яда и этанола почти в два раза снижало величину летальной дозы исследуемых веществ.

**3.2. Сравнительная характеристика токсического действия пчелиного яда и этанола при внутриартериальном и внутривенном введениях.** В предыдущих экспериментах было выяснено, что прохождение через воротную систему печени однонаправленно влияет на активность пчелиного яда и этанола. Поскольку при этом исследуемые вещества должны миновать систему вено-венозных капилляров и синусоидов печени, в которых скорость кровотока относительно низкая, возникает вопрос о специфичности защитного влияния печени по отношению к данным ядам.

В опытах на крысах оценивали суммарную дозу, вызвавшую гибель животного, при дробном введении пчелиного яда и этанола в бедренную вену или хвостовую артерию. В последнем случае, очевидно, что исследуемые вещества, попадая ретроградно в артериальное русло, должен пройти через капиллярную систему задней части тела животного, прежде чем попадет в нижнюю полую вену.

В ходе исследований было выяснено, что токсичность пчелиного яда существенно отличается при внутривенном и внутриартериальном введении. Так, при внутривенном введении крысы погибали после 2-3 введений тестовой дозы яда (2 мг/кг), а при внутриартериальном введении – после 6-7 введений. Средняя суммарная доза составила  $5.7 \pm 1.1$  мг/кг и  $13.3 \pm 0.4$  мг/кг соответственно.

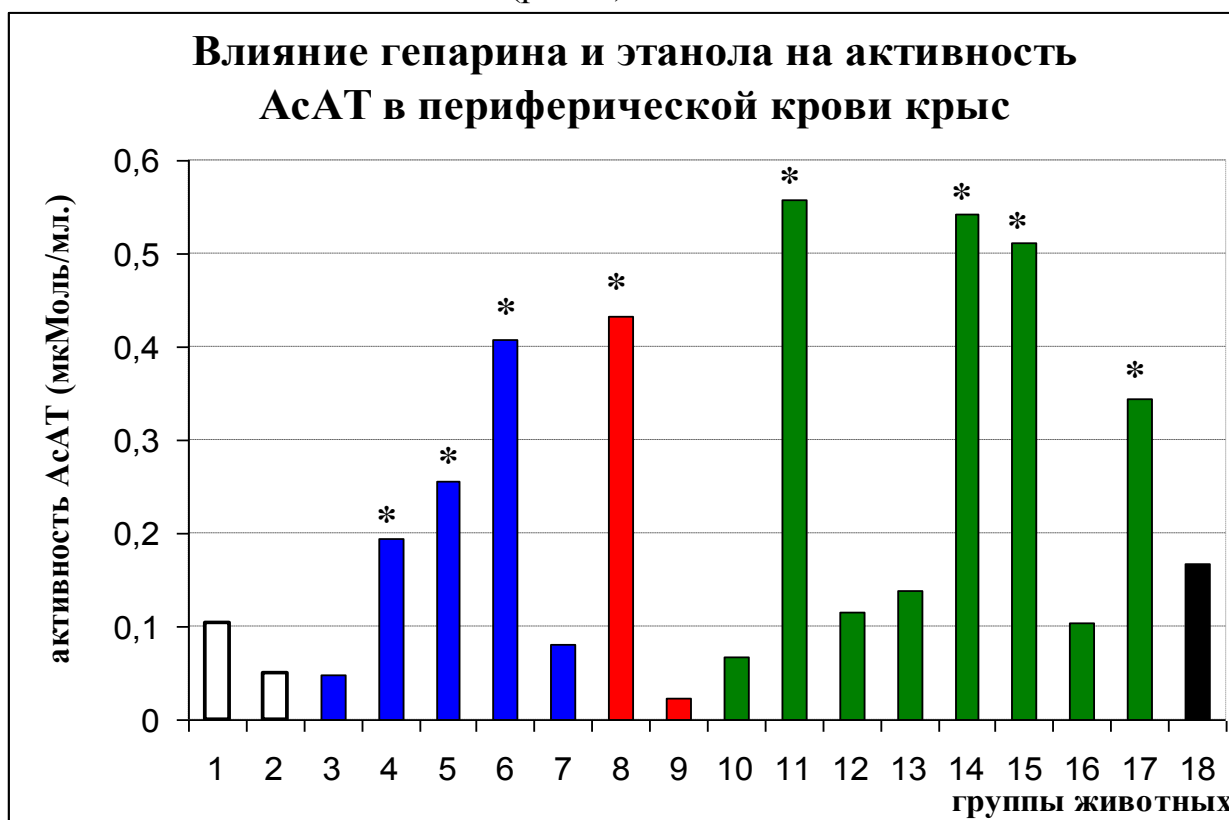
#### **4. Модификация гепарином активности аминотрансфераз при действии пчелиного яда и этанола**

В нашей работе после введения пчелиного яда наблюдалось повышение уровня активности аминотрансфераз в периферической крови крыс. Активность аланинаминотрансферазы, определенная по прошествии 1 часа от введения пчелиного яда в дозе 2 мг/кг повысилась в 3 раза по сравнению с контролем. Через 6 часов после введения яда активность фермента снижалась до уровня, статистически не отличающегося от контроля.

Нейтрализация эндогенного гепарина протамином сульфатом в количестве 10 мг/кг вызывала не слишком значительное, но статистически достоверное повышение активности АЛТ, в то время как введение пчелиного яда (2 мг/кг) на фоне протамина сульфата вызывало увеличение уровня фермента более чем в 3,5 раза.

Повышение активности аминотрансфераз можно объяснить воздействием компонентов апитоксина непосредственно на мембраны клеток. Известно, что мелиттин – мембранолитик, поэтому он изменяет проницаемость мембраны (Хомутов и др., 2005) и таким путем может влиять на локализацию и активность ферментов.

У интактных животных активность АлАТ и АсАТ равна  $0,156 \pm 0,064$  и  $0,103 \pm 0,025$  мкМ/мл соответственно. Введение физиологического раствора в объёме 1 мл многократно снижает активность АлАТ ( $0,061 \pm 0,030$ ) и более чем в два раза снижает активность АсАТ ( $0,051 \pm 0,013$ ) относительно интактных животных. В связи с тем, что исследуемые вещества мы разводили в физиологическом растворе, в качестве контроля для статистической обработки были взяты именно эти данные (рис. 7).



**Рис. 7. Влияние гепарина, этанола и протамина сульфата на активность аспаратаминотрансферазы**

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 1. Интактная группа;                                | 2. Контроль (физ.раствор);           |
| 3. Гепарин (500 МЕ/кг);                             | 4. Гепарин (1000 МЕ/кг);             |
| 5. Гепарин (2500 МЕ/кг);                            | 6. Гепарин (3000 МЕ/кг);             |
| 7. Гепарин (5000 МЕ/кг);                            | 8. Этанол (12%, 0,5 мл/200г);        |
| 9. Этанол (20%, 0,5 мл/200г);                       | 10. Гепарин(500 МЕ/кг)→ Этанол(12%); |
| 11. Гепарин(1000 МЕ/кг) →Этанол(12%, 0,5 мл/200г);  |                                      |
| 12. Гепарин (2500 МЕ/кг) →Этанол(12%, 0,5 мл/200г)  |                                      |
| 13. Гепарин(2500 МЕ/кг) → Этанол(20%, 0,5 мл/200г)  |                                      |
| 14. Гепарин(2500 МЕ/кг) + Этанол(20%, 0,5 мл/200г)  |                                      |
| 15. Гепарин (5000 МЕ/кг) → Этанол(12%, 0,5 мл/200г) |                                      |

16. Этанол (12%, 0,5 мл/200г) → Гепарин(500 МЕ/кг)
17. Этанол(12%, 0,5 мл/200г) → Гепарин(2500 МЕ/кг)
18. Протамин сульфат(1 мг/кг) → Этанол (12%,0,5мл/200г)

При введении гепарина в дозах от 1000 МЕ/кг до 5000 МЕ/кг активность АлАТ повышается и достигает при введении гепарина 5000 МЕ/кг  $0,405 \pm 0,048$  мкМ/мл. При оценке активности АсАТ установлено, что его активность возрастает в тех же пределах, за исключением введения гепарина в дозе 5000 МЕ/кг ( $0,081 \pm 0,065$  мкМ/мл) (рис. 7).

Этанол (12%, 0,5 мл/200г) повышает активность АлАТ и АсАТ, однако 20% этанол объёме 0,5 мл/200г снижает активность АлАТ до  $0,185 \pm 0,022$  мкМ/мл, АсАТ – до  $0,022 \pm 0,017$  мкМ/мл, сравнимых с контрольными величинами.

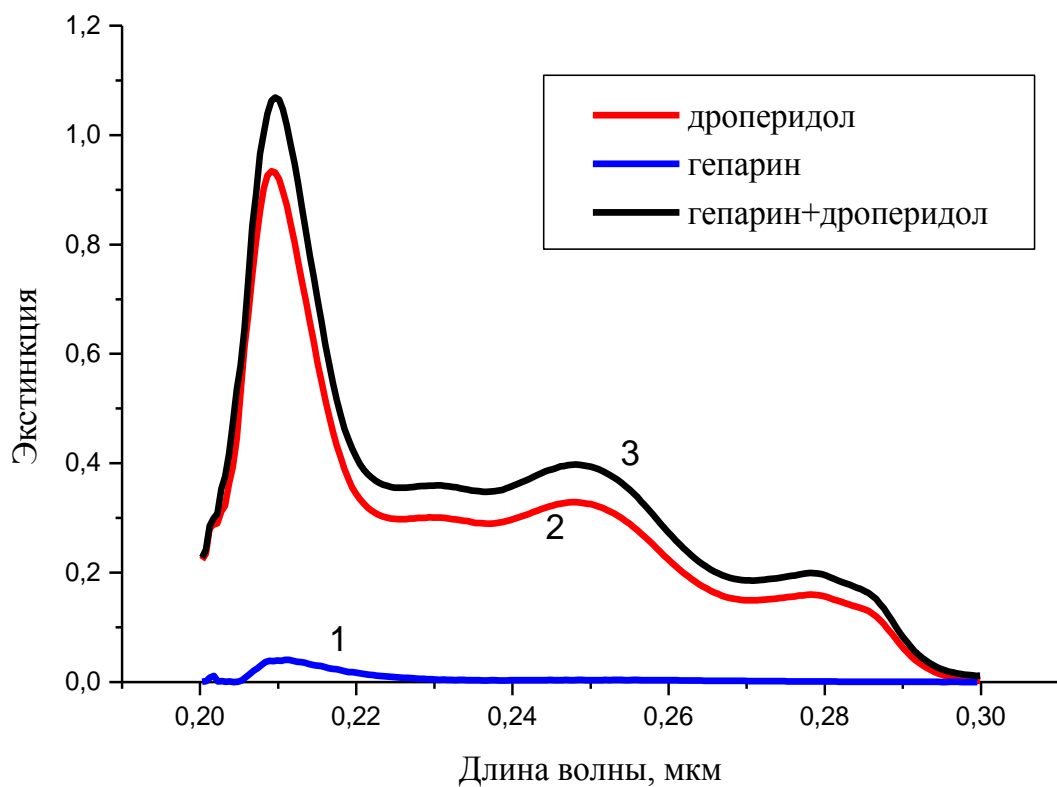
Гепарин повышает активность АлАТ и АсАТ, однако следует сказать, что активность АсАТ при введении высокой дозы (5000 МЕ/кг) гепарина резко снижается. Гепарин, вероятно, воздействует на состояние дисферментемии применительно к АсАТ, что, возможно, связано с влиянием гепарина на конститутивный или индуктивный синтез АсАТ в печени или других органах и тканях, а также с образованием биокомплекса гепарин + трансаминазы (Федянин, Патеюк, 1973).

### **5. Взаимодействие гепарина с исследуемыми веществами in vitro**

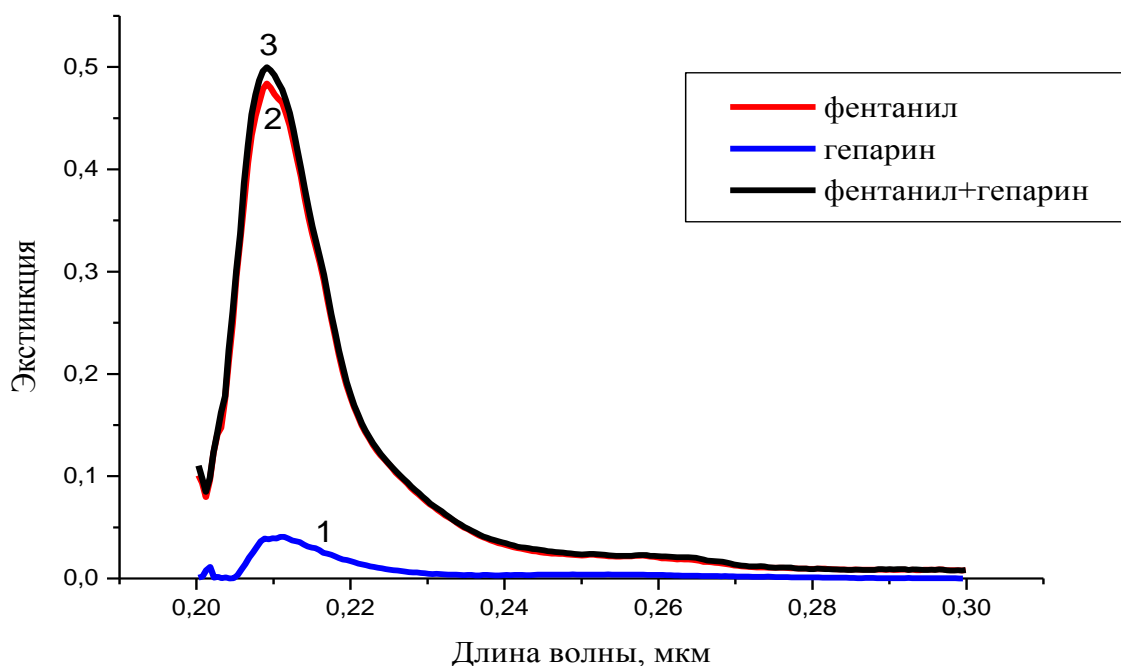
Используя метод фотоэлектроколориметрии и анализ спектров поглощения в УФ области, было показано, что гепарин изменяет оптическую плотность растворов пчелиного яда, мелиттина, этанола, дроперидола, аминазина, оксибутирата натрия, и не влияет на растворы фосфолипазы А<sub>2</sub> пчелиного яда, димедрола и фентанила.

Анализ спектров поглощения показал, что гепарин взаимодействует с пчелиным ядом, мелиттином, этанолом, дроперидолом (рис. 8) и не взаимодействует с фентанилом (рис. 9).

Таким образом, в результате проведённых исследований было установлено, что гепарин как *in vivo*, так и *in vitro* модифицирует свойства пчелиного яда, мелиттина, этанола, дроперидола, аминазина, оксибутирата натрия (ГОМК) и не изменяет свойств фосфолипазы, димедрола и фентанила. На наш взгляд в основе механизма этого феномена лежит способность гепарина образовывать комплексные соединения с рядом веществ, разной химической структуры. Так, например, в состав мелиттина входят положительно заряженные аминокислоты, за счёт которых и происходит взаимодействие. В молекуле дроперидола содержится фтор, имеющий положительный заряд, а, как известно гепарин обладает высоким отрицательным зарядом. Кроме того, гепарин может взаимодействовать за счёт электростатического вектора.



**Рис. 8. Спектры поглощения дроперидола (0,01мг/мл), гепарина (5МЕ/мл) и их смеси в УФ-области**



**Рис. 9. Спектры поглощения фентанила (0,008мг/мл), гепарина (5МЕ/мл) и их смеси в УФ-области**  
**ВЫВОДЫ**

1. Экзогенный гепарин снижает токсические свойства пчелиного яда, этанола, аминазина, но не снижает токсических свойств димедрола. Гепарин снижает продолжительность наркотического сна, вызванного этанолом, амиразином и оксибутиратом натрия. Гепарин снижает гиподинамическое действие дроперидола и этанола. Предварительное введение протамин сульфата увеличивает токсичность, увеличивает продолжительность сна, увеличивает показатели гиподинамии исследуемых веществ.

2. Гепарин снижает латентный период реакции отведения хвоста при введении пчелиного яда, дроперидола и аминазина и увеличивает ЛП РОХ при введении фентанила. Предварительное введение гепарина увеличивает латентный период реакции облизывания лап при введении пчелиного яда, дроперидола и фентанила.

3. Токсические свойства пчелиного яда и этанола в значительной мере снижаются при введении в воротную вену печени по сравнению с инъекцией в бедренную вену. Пчелиный яд и этанол при введении в хвостовую артерию крыс в меньшей степени проявляют свои токсические свойства, чем при введении в бедренную вену. Экзогенный гепарин усиливает антидотное действие печени, а протамин сульфат снижает детоксицирующую функцию печени.

4. Экзогенный гепарин в дозе 50 МЕ/кг снижает активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ), в дозе 5000 МЕ/кг максимально повышает активность АлАТ, в дозе 3000 МЕ/кг максимально повышает активность АсАТ. Пчелиный яд и этанол повышают актив-

ность АлАТ и АсАТ в периферической крови крыс. Пчелиный яд на фоне действия гепарина потенцирует активность АлАТ и АсАТ. Этанол в зависимости от дозы и способа введения с гепарином увеличивает или уменьшает активность АлАТ и АсАТ относительно контрольных величин.

5. В экспериментах *in vitro*, используя метод фотоэлектроколориметрии и анализа спектров поглощения в УФ области, показано взаимодействие исследуемых веществ в стехиометрических отношениях. Максимальный пик светопоглощения регистрируется при соотношении пчелиный яд-гепарин 1:0.3, мелиттин-гепарин 1:0.5, этанол-гепарин 20:1, дроперидол-гепарин 1:3, оксибутират нария-гепарин 1:3, аминазин 2.5:1, протамина сульфат-гепарин 1:1. Фентанил и димедрол с гепарином не взаимодействуют.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Пурсанов К.А., Хомутов А.Е., Бутылин А.Г., Слободянюк В.С. Влияние гепарина на нейролептические свойства аминазина // Нижегородский медицинский журнал, 2008. № 5. – С. 73-77.

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

3. Пурсанов К.А., Хомутов А.Е., Бутылин А.Г., Слободянюк В.С. Влияние гепарина, протамина сульфата, этанола и их сочетанного применения на показатели сна экспериментальных животных // Медицинский альманах, 2009. № 3(8). С. 136-137.

4. Бутылин А.Г., Звонкова М.Б., Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Слободянюк В.С. Влияние гепарина на антиноцицептивные свойства пчелиного яда // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, 2010. №2(2). С.607-611.

5. Звонкова М.Б., Хомутов А.Е., Бутылин А.Г., Пурсанов К.А., Слободянюк В.С., Перепелюк З.В. Влияние высоких доз гепарина на процессы гемостаза // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, 2010. № 2(2). С. 636-641.

6. Крылов В.Н., Малиновская С.Л., Слободянюк В.С., Малиновский Д.С. Влияние этанола, гепарина и протамина сульфата на активность аланин- и аспаргатаминотрансферазы // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2011. № 2, Ч. 1. – С. 98-102.

### **Статьи в региональных изданиях и материалах конференций:**

7. Пурсанов К.А., Слободянюк В.С., Хомутов А.Е. Снижение токсического действия пчелиного яда при предварительном введении гепарина // Апитерапия сегодня. – Рыбное, 2006. – С. 82-84.

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

9. Слободянюк В.С. Влияние гепарина на антиноцицептивное действие этанола. Материалы III Всероссийского с международным участием конгресса



са студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». 24-29 мая 2010. Н. Новгород, 2010. С. 149-150.

10. Хомутов А.Е., Слободянюк В.С., Бочкарёва А.В., Перепелюк З.В. Торможение этанолом гиподинамии крыс, вызванной пчелиным ядом. Материалы Международной конференции «Пчеловодство – XXI век». Москва, 17-20 мая 2010. С. 241-243.

11. Слободянюк В.С., Перепелюк З.В., Хомутов А.Е. Сравнительная характеристика внутрифеморального и интрапортального введения пчелиного яда // Материалы 16 Всероссийской конференции «Успехи апитерапии». Ярославль 8-11 октября 2011. С. 159-160.

12. Пурсанов К.А., Бутылин А.Г., Слободянюк В.С., Малиновский Д.С., Хомутов А.Е. Влияние гексенала на антидотный эффект гепарина при отравлении пчелиным ядом // Материалы 16 Всероссийской конференции «Успехи апитерапии». Ярославль 8-11 октября 2011. С. 166-167.

Подписано в печать 27.10.2011 г. Формат 60×84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 1. Заказ № 697. Тираж 100 экз.

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в РИУ ННГУ им. Н.И. Лобачевского.  
603000, г. Нижний Новгород, ул. Б. Покровская, 37

