

БИОЛОГИЯ

УДК 599: 539.1.047

ИЗМЕНЕНИЕ РЕАКТИВНОСТИ КРОВИ КРЫС ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

© 2009 г.

*А.В. Дерюгина, С.В. Копылова, М.Н. Таламанова,
О.А. Чигарова, В.Н. Крылов*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kfg@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 03.02.2009

Исследованы электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) и лейкоцитарная формула (ЛФ) крови крыс при введении пчелиного яда разными способами: внутривенно, подкожно, ингаляционно и перорально. Показана однотипность динамики ЭФПЭ и ЛФ при действии пчелиного яда независимо от способа его введения в организм. Выявлено, что наряду с общими реакциями организма, возникающими в ответ на введение пчелиного яда любым из изученных способов, проявляются и местные реакции, в зависимости от способа введения модифицирующие общий ответ организма.

Ключевые слова: электрофоретическая подвижность, пчелиный яд, лейкоцитарная формула.

Введение

Известно, что пчелиный яд в малых дозах обладает выраженным лечебным действием и является основным средством апитерапии [1]. Апитоксин при лечебном воздействии можно вводить в организм различными способами (пчелоужалением, парентерально, ингаляционно, нанесением на кожу и т.д.). Укажем, что наиболее эффективные способы введения (ужаления, инъекции) одновременно и самые болезненные. В то же время практически не изучена в сравнительном аспекте эффективность апитерапии при других способах введения яда в организм больного. Кроме того, укажем, что доказательство возможности приема яда перорально позволило бы применять его без проявления болевых побочных эффектов. В связи с указанной целью работы было исследование эффективности действия пчелиного яда при разных способах введения в организм экспериментальных животных. При этом за меру эффективности считали выраженность адаптационных реакций организма, оцениваемых по изменению стандартных показателей крови. В качестве таких показателей исследовались электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) и лейкоцитарная формула (ЛФ). Прогностические возможности ЛФ определяются в настоящее

время тем, что показатели лейкограммы отражают интегральные характеристики всех гомеостатических систем организма, формирующих неспецифические адаптационные реакции [2], в то время как динамика изменения ЭФПЭ отражает вовлечение в реакцию адаптации симпатoadrenalовой и гипофизарно-надпочечниковой систем [3].

Материалы и методы

Опыты проводились на белых крысах массой 180–200 г. Были проведены четыре серии экспериментов. Во всех сериях животные получали пчелиный яд в дозе 0.1 мг/кг.

В 1-й серии животным внутривенно вводился пчелиный яд, контрольным животным в том же объеме вводили физиологический раствор. Во 2-й серии животным вводили пчелиный яд подкожно. Контролем служили крысы при подкожном введении физиологического раствора. В 3-й серии животных подвергали ингаляции. Ингаляция крыс осуществлялась однократно при помощи ингалятора ИУП-01 М. Крысы помещались в ингаляционную камеру и ингалировались водным раствором пчелиного яда в течение 10 мин. Контрольным животным проводили ингаляцию водой в течение такого же интервала времени.

В 4-й серии животным скармливали смесь меда с пчелиным ядом. Контролем являлись животные, получавшие только мед (2 г/кг). Скармливание осуществляли одноразово в течение 7 дней. Суммарная доза токсина составила 0.1 мг/кг.

Кровь для анализа брали из подъязычной вены через 1 сутки и 1 неделю после воздействия. В те же временные промежутки анализировали кровь интактных животных. Исследовали ЭФП отмытых эритроцитов и лейкоцитарную формулу. ЭФП измеряли методом микроэлектрофореза [4]. Установка для определения ЭФП состояла из горизонтальной микрокамеры, микроскопа, источника постоянного тока. Использовали электроды системы Ag/AgCl. Для измерения подвижности 0.1% суспензию эритроцитов помещали в трис-HCl-буфер (pH = 7.4) и фиксировали перемещение клеток при силе тока в 8 мА. В каждом опыте фиксировали время перемещения 6 клеток в 2 направлениях, измеряя знак заряда на электродах полярным переключателем. Величину ЭФП определяли по формуле: $U = S/TH$, где S – расстояние, на которое перемещается эритроцит, T – время перемещения клеток на расстояние S , H – градиент потенциала.

Подсчет лейкоцитарной формулы проводили общепринятым методом [5], с учетом рекомендации Л.Х. Гаркави (1998).

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, обрабатывали статистически с помощью критерия Стьюдента [6].

Результаты и их обсуждение

Исследование ЭФП крови крыс показало однотипность ее изменения при введении животным пчелиного яда всеми изучаемыми способами. При этом ЭФП при всех способах введения токсина превышала ЭФП в соответствующих контрольных группах на 1-е сутки. Различия носили только количественный и временной характер. Наибольший рост показателей ЭФП относительно контрольных значений наблюдался у животных, получавших пчелиный яд при скармливании *per os* (до 3.56 ± 0.38 мкм·см/В·с от 2.89 ± 0.18 мкм·см/В·с контрольных значений) и ингаляционно (до 1.21 ± 0.12 мкм·см/В·с от 0.81 ± 0.04 мкм·см/В·с контроля).

Следует подчеркнуть, что на 1-е сутки ЭФП у контрольных групп животных (внутрибрюшинном, подкожном уколах и ингаляции) также изменялась и была существенно ниже значений данного показателя интактных животных. Мы полагаем, что это снижение является

ответной реакцией организма на болевое раздражение, вызванное манипуляцией введения физиологического раствора. Таким образом, использование пчелиного яда ограничивало снижение ЭФП, наблюдаемое в контрольных группах. В отличие от этих экспериментов, при скармливании пчелиного яда снижения ЭФП не наблюдалось как в контрольной, так и в опытной группах животных (рис. 1А).

Анализ длительности эффекта на введение яда показал, что к 7-м суткам регистрировалось уменьшение ЭФП при кормлении крыс апитоксином, тогда как ЭФП при внутрибрюшинном, подкожном и ингаляционном введениях оставалась повышенной относительно контроля, который, в свою очередь, восстанавливался до интактных значений (рис. 1В). Таким образом, можно заключить, что при парентеральном и ингаляционном способах введения яда эффект нарастал, а при скармливании – снижался.

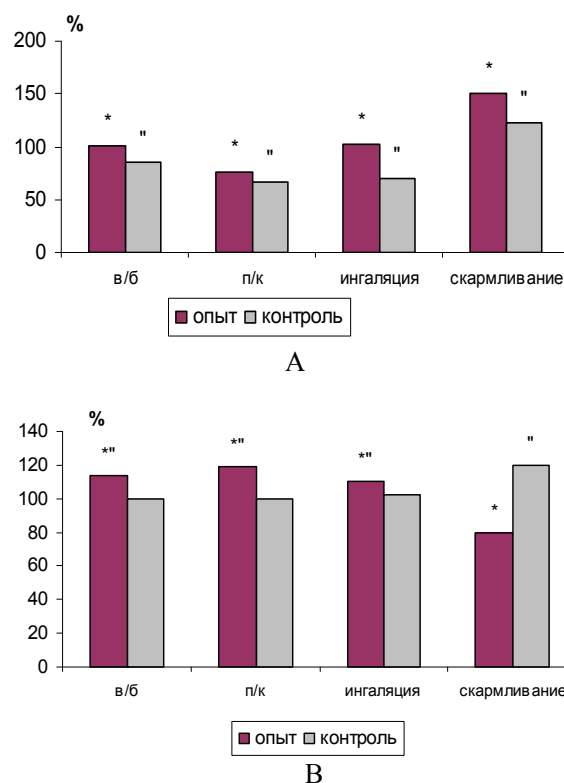


Рис. 1. Изменение ЭФП крови крыс при различных способах введения пчелиного яда. А – через сутки, В – через неделю после введения апитоксина (* – относительно контроля, " – относительно интактных; 100 % – уровень ЭФП интактных животных)

Ранее нами [7] было показано, что изменение ЭФП у животных при введении пчелиного яда носит двухфазный характер, являясь однотипной реакцией организма на воздействие различных видов стресса. Первая фаза (падение)

ЭФПЭ связана с активацией симпато-адреналовой системы, тогда как вторая фаза (увеличение) имеет долгосрочное действие и определяется действием гипофизарно-надпочечниковой системы. Кроме того, было показано, что при внутрибрюшинном введении пчелиного яда ЭФПЭ уменьшалась в течение 30–40 мин с последующим существенным повышением [8].

В соответствии с указанными положениями можно объяснить количественные различия ЭФПЭ при проведении экспериментов. Укол и ингаляционные процедуры сами по себе являются стрессорирующими факторами, при которых наиболее выражена 1-я фаза стресса, связанная с активацией симпато-адреналовой системы. В этих случаях пчелиный яд, вызывающий длительную и интенсивную активацию коры надпочечников, ограничивает протекание 1-й фазы на болевое раздражение и обеспечивает более длительное проявление 2-й фазы с соответствующим восстановлением ЭФПЭ до уровня интактных животных. Напротив, пероральное скормливание яда, не приводя к болевой активации симпато-адреналовой системы, обеспечивает повышение ЭФПЭ на протяжении 1-х суток без компенсации 1-й фазы, соответственно, увеличивая эффект повышения ЭФПЭ над его уровнем у интактных животных (рис. 1А).

На основании полученных данных можно считать, что при всех способах введения пчелиного яда наблюдается активация гипофизарно-надпочечниковой системы, по интенсивности наиболее выраженная при поступлении токсина *per os* и ингаляционно, а по продолжительности – при внутрибрюшинном, подкожном и ингаляционном введениях.

В целях выявления зависимости интенсивности изменения ЭФПЭ от уровня общей активации организма при разных способах введения пчелиного яда был проведен анализ лейкоцитарной формулы крови крыс. Анализ реакций по количеству лимфоцитов показал, что к 1-м суткам у животных наблюдалась реакция активации системы как в контрольных, так и в опытных группах. Уровень лимфоцитов в ЛФ превышал 70% от общего количества лейкоцитов. Однако в случае введения апитоксина подкожно и ингаляционно, когда у контрольных групп животных наблюдалось максимальное уменьшение ЭФПЭ относительно интактных значений (превалировала 1-я фаза стресса), изменение ЛФ свидетельствовало о переактивации организма, т.к. содержание лимфоцитов в ЛФ превышало 80% (рис. 2А). Через неделю реакция переактивации была зарегистрирована только при ингаляции животным раствором пчелиного яда, при осталь-

ных способах введения токсина сохранялась реакция активации (рис. 2В).

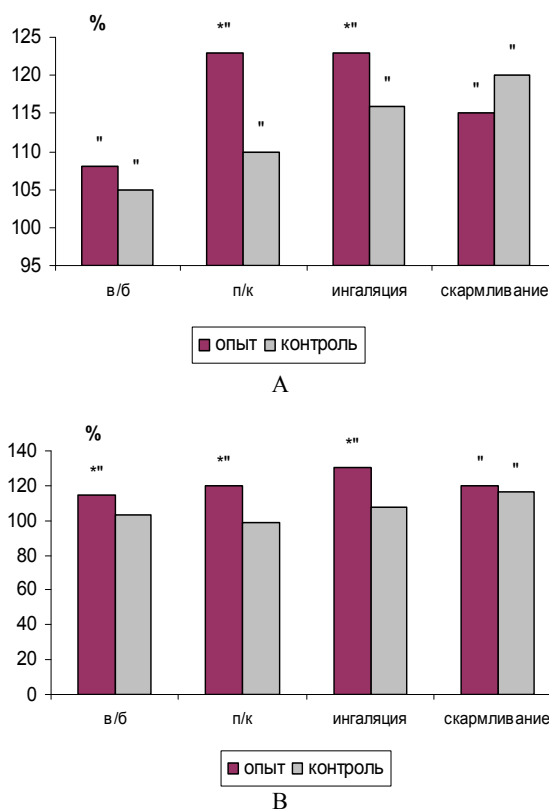


Рис. 2. Изменение количества лимфоцитов в крови крыс при различных способах введения пчелиного яда. А – через сутки, В – через неделю после введения апитоксина (* – относительно контроля, " – относительно интактных; 100% – уровень лимфоцитов интактных животных)

Таким образом, анализ ЛФ показал, что все исследованные воздействия (как контроль, так и опыт) вызывают реакцию активации. При этом исследование динамики ЭФПЭ позволило выявить вклад симпато-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой систем в развитие реакции активации.

Выявленное длительное поддержание реакции активации организма и увеличение ЭФПЭ при внутрибрюшинном введении апитоксина свидетельствуют о повышении неспецифической резистентности организма и позволяют считать данный способ поступления яда одним из оптимальных. С другой стороны, введение пчелиного яда скормливанием исключает (или существенно уменьшает) развитие 1-й фазы стресса с преобладанием 2-й фазы, что говорит в пользу быстрой активации адаптационных систем. Механизм этого эффекта может быть обеспечен возможностью всасывания пчелиного яда в кишечнике в неизменном виде или в виде отдельных блоков, которые также могут быть эффективными, например 3–4-звенные

остатки белков – со свойствами регуляторных пептидов, как это было показано нами ранее [1]. При этом усиление эффектов может опосредоваться не только гипофизарно-надпочечниковыми механизмами, но и опиатными. Напротив, подкожное и ингаляционное введение токсина на фоне существенного падения ЭФПЭ вызывает переактивацию организма. Наблюдаемые эффекты, по всей видимости, связаны с особенностью введения токсина. Подкожное введение токсина сопряжено с развитием местных реакций, связанных с усиленным выбросом гистамина в ответ на действие яда, а при ингаляционном введении компоненты яда могут вызывать рефлекторное воздействие, приводя к сужению легочных артерий и развитию местных реакций легочной ткани.

Таким образом, проведенный анализ позволяет заключить, что наряду с общими реакциями организма, возникающими в ответ на введение пчелиного яда любым из изученных способов, проявляются и местные реакции, в зависимости от способа введения модифицирующие общий ответ организма. Несомненно, это должно учитываться при проведении апитерапии заболеваний человека.

Список литературы

1. Крылов В.Н., Агафонов А.В., Кривцов Н.И. и др. Теория и средства апитерапии. М., 2007. 296 с.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 1977. 119 с.
3. Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2005. Т. 136. № 4. С. 364–366.
4. Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. Минск, 1974. 144 с.
5. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Медицинские лабораторные анализы. Справочник. М.: Трида-Х, 2007. 304 с.
6. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
7. Крылов В.Н., Густов А.В., Дерюгина А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов и стресс // Физиология человека. 1998. Т. 24. № 6. С. 108–111.
8. Дерюгина А.В. Исследование электрофоретической подвижности и агрегационных свойств эритроцитов при действии пчелиного яда и его компонентов: Автореф. дис... канд. биол. наук. Н. Новгород, 1998. 20 с.

CHANGES OF RAT BLOOD REACTIVITY IN DIFFERENT METHODS OF BEE VENOM INTRODUCTION

A.V. Deryugina, S.V. Kopylova, M.N. Talamanova, O.A. Chigarova, V.N. Krylov

The electrophoretic mobility of erythrocytes (EPME) and the leukocyte formula (LF) of rat blood were studied for different methods of bee venom introduction: intraperitoneal, subcutaneous, inhalation and per os. The uniformity of EPME and LF time histories has been shown under the bee venom action irrespective of its introduction method. It has been found that alongside bodily reactions to the bee venom introduced by any of the methods, local reactions dependent on the introduction method are observed that modify the general body response.

Keywords: electrophoretic mobility, bee venom, leukocyte formula.