

УДК 599: 539.1.047

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО АДАПТАЦИОННОГО ОТВЕТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ ПЧЕЛИНОГО ЯДА В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

© 2009 г. А.С. Корягин¹, М.Н. Таламанова¹, Е.А. Александрова², А.Л. Маленев³¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского² Нижегородская государственная медицинская академия³ Институт экологии Волжского бассейна РАН

manjatal@ya.ru

Поступила в редакцию 03.02.2009

В экспериментах на крысах изучены адаптогенные эффекты пчелиного яда в составе наноконструктов при пероральном введении. Показано, что курсовое введение животным наночастиц на основе золота, хитозана и пчелиного яда приводит к развитию неспецифической адаптационной реакции активации, диагностируемой по показателям периферической крови.

Ключевые слова: наночастицы золота, пчелиный яд, адаптационный ответ.

Введение

В настоящее время активно проводятся исследования адаптогенных свойств малых доз пчелиного яда. Ранее было показано, что зоотоксины пчелы при предварительном парентеральном (внутрибрюшном) введении животным в нетоксичных дозах, приводящих к развитию реакции активации, оказывают пролонгированный адаптогенный эффект к повреждающему действию ионизирующей радиации [1]. Реакция активации – одна из трех известных в настоящее время неспецифических адаптационных реакций организма. Она развивается в ответ на относительно средние по силе воздействия. В отличие от стресса изменения, возникающие при данной реакции, по своему характеру близки к вариантам физиологической нормы.

Парентеральное введение (в форме инъекций) делает практически невозможным применение пчелиного яда в клинической практике, так как его составляющие обладают высокой антигенной активностью, что может привести к возникновению ряда иммунологических реакций. Химическая природа яда пчелы исключает его пероральное применение (через рот) в связи с тем, что его белковые компоненты подвергаются протеолитическому действию пищеварительных ферментов желудка и тонкого кишечника, распадаясь в конечном итоге до свободных аминокислот.

Современные достижения в области нанотехнологий позволяют создавать наночастицы, способные, при пероральном введении в орга-

низм, преодолевать эпителиальный барьер кишечника и попадать в кровь [2]. Это является важным аспектом при создании и использовании препаратов на основе пчелиного яда в практической медицине.

В литературе имеются единичные работы по применению комплекса пчелиного яда и меда перорально [3]. Исследований адаптогенного действия пчелиного яда в составе наночастиц при введении через рот экспериментальным животным не проводилось.

Целью работы явилось установление типа адаптационного ответа у экспериментальных животных при пероральном введении различных доз пчелиного яда в составе наночастиц золота в условиях относительной нормы.

Материалы и методы

Работа была проведена на белых нелинейных крысах-самцах массой 200–220 г, которые содержались на стандартном рационе вивария.

Наноконструкты, содержащие наночастицы золота, хитозан и пчелиный яд, были получены в соответствии с методикой на кафедре высокомолекулярных соединений химического факультета ННГУ [4]. В качестве стабилизатора наночастиц золота использовали продукт деацетилирования природного полисахарида хитина – хитозан. Средний размер наночастиц золота в наноконструкте составлял 10–15 нм.

Животные были разделены на 4 группы по 5 особей в каждой. Первая группа – интактные животные, которые не подвергались каким-либо

воздействиям, и их показатели принимались за относительную норму. Животным 2-й группы вводили раствор наночастиц, содержащий золото и хитозан. Эта группа служит контролем. Вводимая доза золота и хитозана составила соответственно 0.5 мг/кг и 100 мг/кг массы животного. Животным 3-й и 4-й групп вводили наночастицы, содержащие золото, хитозан и пчелиный яд, в дозах 0.5 и 1 мг/кг соответственно.

Исследуемые препараты вводили в объеме 1 мл перорально (через рот с помощью зонда) в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. Забор крови осуществляли из подъязычной вены на 1-е, 7-е и 14-е сутки после окончания курса введения и определяли показатели периферической крови: содержание гемоглобина, эритроцитов и общего количества лейкоцитов [5]. Расчет лейкоцитарной формулы производили общепринятым методом с окраской мазков по Романовскому – Гимзе. Нами были учтены рекомендации Л.Х. Гаркави по подсчету лейкоцитарной формулы при использовании ее в качестве сигнального показателя системных неспецифических реакций. При развитии стресс-реакции количество лимфоцитов снижается, а при реакции активации – увеличивается [6].

Дополнительно был рассчитан лейкоцитарный коэффициент, который показывает отношение процентного содержания лимфоцитов к процентному содержанию сегментоядерных нейтрофилов в лейкограмме. При развитии неспецифической реакции активации наблюдается увеличение данного показателя по отношению к интактным животным, показатели которых принимаются за относительную норму [6].

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента с помощью программы Biostat [7].

Результаты и их обсуждение

Как показано в табл. 1, курсовое пероральное введение наночастиц на основе золота, хи-

тозана и пчелиного яда в дозах 0.5 и 1 мг/кг не приводило к изменениям в системе красной крови. Уровень эритроцитов в опытных группах существенно не отличался от интактной и контрольной групп. Изменения содержания гемоглобина в группах, которым вводился яд пчелы, практически не происходило.

Изменения, наблюдаемые в лейкоцитарной формуле на 1-е сутки в группе животных, которым вводили яд пчелы в дозе 0.5 мг/кг в составе наночастиц, сопровождались статистически значимым ($p \leq 0.05$) увеличением количества лимфоцитов по отношению к интактным животным. Количество сегментоядерных нейтрофилов было статистически значимо ($p \leq 0.05$) ниже уровня интактных и контрольных животных. Изменения общего количества лейкоцитов не происходило.

В группе животных, которым вводили яд пчелы в дозе 1.0 мг/кг, количество сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов не отличалось статистически от уровня интактных и контрольных животных.

При подсчете лейкоцитарного коэффициента было показано, что в контрольной группе и в группе животных, которой вводили яд пчелы в дозе 1.0 мг/кг в составе наночастиц, данный коэффициент варьировал на протяжении 14 суток и статистически не отличался от значений интактных животных (табл. 2).

В группе животных, которым вводили яд пчелы в дозе 0.5 мг/кг в составе наночастиц, наблюдалось статистически значимое ($p \leq 0.05$) увеличение лейкоцитарного коэффициента на 1-е сутки по отношению к интактным и контрольным животным. В течение двух недель значения данного коэффициента были статистически значимо ($p \leq 0.05$) выше по отношению к интактным животным.

В результате эксперимента показано, что многократное введение пчелиного яда в дозе 0.5 мг/кг в составе наночастиц золота приводило к

Таблица 1

Влияние курсового перорального введения зоотоксинов пчелы (7 дн.) на некоторые показатели периферической крови крыс в условиях относительной нормы на 1-е сутки

Показатели	Группы животных			
	Интактные	Контроль (хитозан + золото)	Яд пчелы 0.5 мг/кг + золото + хитозан	Яд пчелы 1.0 мг/кг + золото + хитозан
Гемоглобин, г/л	147.8 ± 14.8	147.4 ± 4.6	163.2 ± 6.95	165.6 ± 6.25
Эритроциты, 10 ¹² /л	4.79 ± 0.14	4.54 ± 0.18	5.3 ± 0.45	5.3 ± 0.31
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	15.6 ± 1.89	12.8 ± 0.49	12.9 ± 0.46	14.9 ± 0.59
Сегментоядерные нейтрофилы, %	13.4 ± 1.6	14.0 ± 0.9	10.7 ± 1.07 *+	15.6 ± 1.18
Лимфоциты, %	62.8 ± 2.8	73.9 ± 2.4	79.4 ± 0.9 *	67.1 ± 4.73

Примечание: * – $p < 0.05$ по отношению к интактным; + – $p < 0.05$ по отношению к контролю.

Таблица 2

Влияние курсового введения яда пчелы, в составе наночастиц золота на лейкоцитарный коэффициент (у.е.)

Группы	1-е сутки	14-е сутки
Интактные	4.1 ± 0.26	3.8 ± 0.15
Контроль (хитозан + золото)	5.3 ± 0.50	4.8 ± 0.6
Яд пчелы 0,5 мг/кг	7.6 ± 0.56 * #	5.7 ± 0.3 *
Яд пчелы 1,0 мг/кг	4.4 ± 0.52	4.1 ± 0.15

Примечание: * – $p \leq 0.05$ по отношению к интактным животным, # – $p \leq 0.05$ по отношению к контрольным животным.

формированию у экспериментальных животных адаптационной реакции устойчивой активации, при которой организм, аналогично стадии резистентности стресса, приобретает устойчивость к самым разнообразным неблагоприятным воздействиям. Однако резистентность, в отличие от стресса, достигается не путём жертвы и повреждения, усиления процессов распада, а более физиологическими механизмами, не приводящими к наступлению фазы истощения, как продолжительный стресс [6, 8, 9]. Следует указать, что такая реакция является типичной при парентеральном (внутрибрюшинном) введении пчелиного яда в дозе 0.1 мг/кг [1]. Более высокая доза пчелиного яда при пероральном введении, вызывающая развитие реакции устойчивой активации, по всей видимости, связана с частичным действием на белковую структуру яда протеаз пищеварительного тракта.

Развитие реакции активации сопровождается появлением перекрестной резистентности к действию различных факторов (ионизирующей радиации, гипоксии и т.д.) [10]. Возникновение резистентности можно представить в виде цепи следующих физиологических реакций.

Возбудимость центральной нервной системы в устойчивую активацию остается умеренно повышенной [9]. При этом быстро возрастает активность ключевого фермента синтеза катехоламинов – тирозингидроксилазы – в мозговом слое надпочечников и в нервных центрах. Содержание глюкокортикоидов претерпевает колебания от нормы до величин, превышающих норму в 1.5 раза, что свидетельствует об увеличении активности стресс-реализующих систем организма — симпато-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой. Параллельно осуществляется активация центральных стресс-лимитирующих систем (ГАМК-ергической, опиоидергической, холинергической, серотонинергической и др.) и стресс-лимитирующих систем клеточного уровня — антиоксидантной, аденозиновой, простагландиновой. Возрастает экспрессия генов, кодирующих структуру «белков

теплового шока», с которыми связывают развитие феномена адаптационной стабилизации структур (ФАСС) — повышения устойчивости клеточных и субклеточных структур (митохондрий, эндоплазматической сети, лизосом, макромолекул) самих по себе к действию повреждающих факторов, что обеспечивает в конечном итоге резистентность организма.

Полученные данные исследований указывают на возможность создания с помощью нанобиотехнологий адаптогенных препаратов, содержащих зоотоксины пчелы, с целью их применения в практической медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (08-02-97031_p_поволжье_а).

Список литературы

1. Корягин А.С., Ерофеева Е.А. Исследование адаптогенных свойств животных ядов к действию повреждающих факторов (на примере ионизирующей радиации) // Поволжский экологический журнал. 2004. № 2. С. 52–58.
2. Хитозан *per os* // Под ред. Р.Н.А. Муццерелли. Н. Новгород: Изд-во «Вектор-ГиС», 2001. 372 с.
3. Ошевский Л.В., Крылова Е.В., Фисенко Н.С. Исследование возможности всасывания интактных пептидов пчелиного яда при скормливании крысам // Вестник ННГУ. Серия Биология. 2005. № 2 (10). С. 168–173.
4. Смирнова Л.А., Александров А.П., Якимович Н.О. и др. УФ-индуцированное формирование наноразмерных частиц золота в полиметилметакрилатной матрице // Доклады Академии наук. 2005. Т. 400. № 6. С. 779–781.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т. 1. Мн.: Беларусь, 2000. 495 с.
6. Гаркави Л.Х. Об общей неспецифической адаптационной «реакции активации», способствующей борьбе организма с опухолью // Вопросы клинической онкологии и нейроэндокринных нарушений при злокачественных новообразованиях. Ростов н/Д, 1968. С. 341–348.

7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
8. Шихлярова А.И., Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Екатеринбург: Филантроп, 2002. 196 с.
9. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б. О критериях оценки неспецифической резистентности организма при действии различных биологически активных факторов с позиции теории адаптационных реакций // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1995. № 6. С. 11–21.
10. Корягин А.С., Ерофеева Е.А., Александрова Е.А. Адаптогенные свойства пчелиного яда при действии экстремальных факторов различной природы // Вестник ННГУ. 2007. № 3. С. 113–115.

**TYPE IDENTIFICATION OF NONSPECIFIC ADAPTATION RESPONSE
OF EXPERIMENTAL ANIMALS TO PER OS INTRODUCTION OF BEE VENOM IN
THE COMPOSITION OF GOLD NANOPARTICLES**

A.S. Koryagin, M.N. Talamanova, E.A. Aleksandrova, A.L. Malenev

Adaptogenic effects of bee venom introduced per os in the composition of nano-composites have been studied in experiments on rats. It has been shown that the course introduction into animals of nanoparticles on the basis of gold, chitosan and bee-venom leads to the development of nonspecific adaptation response that can be diagnosed by the indicators of peripheral blood.

Keywords: composition of gold nanoparticles, bee venom, adaptation response.