

# Ф И З И О Л О Г И Я

УДК 612.57

## ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНА НА АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПЧЕЛИНОГО ЯДА

© 2010 г.

А.Г. Бутылин<sup>1</sup>, М.Б. Звонкова<sup>1</sup>, А.Е. Хомутов<sup>1</sup>,  
К.А. Пурсанов<sup>2</sup>, В.С. Слободянюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

kfg@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 01.04.2010

В экспериментах на белых беспородных крысах-самцах показано, что экзогенный и эндогенный гепарин, введённый предварительно или в виде инкубированной смеси с пчелиным ядом, в значительной степени снижает антиноцицептивное действие апитоксина как на спинальном, так и на супраспинальном уровне.

*Ключевые слова:* гепарин, пчелиный яд, антиноцицептивные свойства.

### Введение

Пчелиный яд является многокомпонентным природным химическим веществом, отличающимся широким спектром биологического действия. В состав пчелиного яда входят мелиттин, являющийся ярко выраженным цитолитиком, апамин, оказывающий возбуждающее действие на центральную нервную систему, MCD-пептид, дегранулирующий тучные клетки, тертиапин, ингибирующий  $Ca^{2+}$ -связывающий белок кальмодулин [1], секапин, вызывающий седативный эффект, гипотермию и пилоэрекцию [2], кардиопеп, обладающий адренемиметическими и антиаритмическими свойствами [3], минимин, вызывающий прекращение роста личинок дрозофил [4].

Адолапин – единственный из всех компонентов пчелиного яда, который обладает болеутоляющим действием. Это действие обусловлено свойством адолапина замедлять биосинтез и фармакологическую активность простагландинов E, которые снижают противоболевой порог. Адолапин препятствует агрегации (склеиванию) эритроцитов крови, а следовательно, принимает участие в предупреждении и лечении тромбоза сосудов. Адолапин угнетает активность двух ключевых ферментов обменных процессов биосинтеза воспаления – циклооксигеназы и липооксигеназы [5].

В предыдущих исследованиях было продемонстрировано, что пчелиный яд способен оказывать антиноцицептивное действие при однократном введении [6], при этом происходит активация апитоксином эндогенной опиоидной системы [7]. 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).

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 92-х беспородных белых крысах-самцах массой 200–210 грамм. Ноцицептивные реакции оценивали по стандартным тестам, позволяющим до определенной степени судить о характере влияния веществ преимущественно на супраспинальном уровне (тест «горячей пластины» – «hot plate»). опыты проводили на животных, прошедших фоновое тестирование, исходные ноцицептивные пороги (фон) которых в тесте I не превышали 8 с, в тесте II – 15 с [8].

При использовании теста «горячей пластины» животных помещали на пластину, нагретую до 57–58<sup>0</sup>С, температуру поверхности

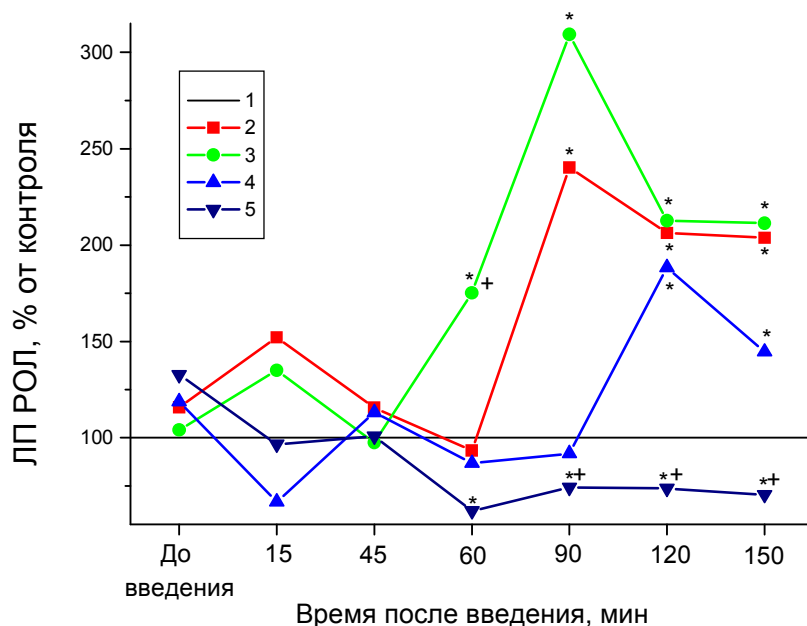


Рис. Влияние пчелиного яда, гепарина и протамина сульфата на реакцию облилизывания лап у мышей. Условные обозначения: 1 – контроль; 2 – пчелиный яд (1 мг/кг); 3 – протамина сульфат (10 мг/кг), пчелиный яд (1 мг/кг); 4 – гепарин (500 МЕ/кг), пчелиный яд (1 мг/кг); 5 – пчелиный яд + гепарин (1:0.5); \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем; + –  $p < 0.05$  по сравнению с пчелиным ядом

пластины регулировали термостатом. По секундомеру засекали время от момента помещения животного на пластину до момента первого облилизывания лап (задних), что и составляло латентный период реакции облилизывания лапок (ЛП РОЛ). Максимальное время нахождения животного на пластине – 25 секунд.

В работе были использованы следующие препараты, которые животным вводили внутривентриально: 1) высокомолекулярный гепарин производства Московского эндокринного завода, содержащий в 1 мл раствора 5000 МЕ (1 МЕ = 0.0077 мг); 2) нативный пчелиный яд; 3) протамина сульфат, содержащий в 1 мл раствора 10 мг сухого вещества.

Анальгетический эффект оценивали в процентах от значений контрольной группы, принимаемых за 100%. Для оценки использовали медианы. Это связано с тем, что средняя арифметическая очень подвержена влиянию крайних членов вариационного ряда, наименее характерных для данной совокупности [9], что в случае использования нами небольших выборок (6–10 особей в группе) недопустимо. Кроме того, определённые ограничения продолжительности измерения вообще исключили в ряде опытов возможность использования какой-либо другой обобщающей характеристики. Поэтому

в наших опытах использование медианы являлось наиболее оправданным.

Исследования антиноцицептивного действия пчелиного яда и его сочетанного применения с гепарином на спинальном и супраспинальном уровнях проводили в камере, пол которой представлял собой электродную сетку. На электроды подавали импульсное напряжение от стимулятора ЭСС-4. Фиксировали минимальное напряжение, при котором животное отвечает двигательной реакцией на электроимпульс.

Достоверность различий между группами оценивали непосредственно по значениям вариант с использованием непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни для независимых совокупностей [10]. Для множественных сравнений применяли критерий Данна [11].

### Результаты и их обсуждение

В первом блоке экспериментов исследовали влияние гепарина на антиноцицептивное действие пчелиного яда на супраспинальном уровне с оценкой латентного периода реакции облилизывания лап. Внутривентриальное введение пчелиного яда в дозе 1 мг/кг сопровождалось увеличением латентного периода, особенно выраженно

Таблица

Влияние гепарина на антиноцицептивные свойства пчелиного яда

Наименование серии	Контроль, мин	Время от введения, мин			
		20	40	60	80
Пчелиный яд (2 мг/кг)	18±0.4	26±1.5	27±1.3*	25±1.9*	21±1.3
Яд + гепарин (1:0.05)	18±0.6	24±1.2	26±1.4*	26±1.6*	20±0.8
Яд + гепарин (1:0.5)	17±0.8	14±1.0	16±1.4	17±1.9	16±1.1
Яд + гепарин (1:5)	15±1.2	18±2.9	23±2.4	20±2.5	20±3.0
Яд + гепарин (1:50)	16±1.4	19±2.1	21±2.0	21±1.8	22±1.4
Яд (1 мг/кг) на фоне гепарина (50 МЕ/кг)	19±0.3	21±1.7	21±1.5	18±1.9	18±0.4
Яд (1 мг/кг) на фоне протамина (10 мг/кг)	19±0.4	31±0.7*	36±1.1*	30±1.7*	25±0.6*

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

го через 15 и 90 мин от момента инъекции (рисунки).

Антиноцицептивное действие яда на фоне предварительного введения гепарина в дозе 500 МЕ/кг в значительной степени ослаблялось, причём через 15 мин. от момента введения яда ЛП РОЛ был ниже контрольных величин (рисунки).

Наиболее выраженным действием на антиноцицептивные свойства пчелиного яда оказывал гепарин, введённый в виде инкубированной смеси с ядом в соотношении яд:гепарин 1:0.5. В этом случае, на протяжении 150 мин величина ЛП РОЛ была ниже контрольных значений (рисунки).

Обратная картина наблюдалась при предварительном введении протамина сульфата – классического антагониста гепарина. При такой постановке эксперимента происходило потенцирование антиноцицептивных свойств пчелиного яда, в результате чего ЛП РОЛ увеличивался более чем на 200% относительно контрольных величин (рисунки).

Введение смеси яд–гепарин в соотношении 1:0.5, 1:5 и 1:50, а также предварительная инъекция 50 МЕ/кг мукополисахарида достоверно не изменяет порога болевой чувствительности относительно контрольных значений (таблица).

Введение классического антагониста гепарина – протамина сульфата – потенцирует антиноцицептивное действие пчелиного яда, в результате чего болевой порог повышается до 36–37 В (таблица).

Таким образом, гепарин в различных вариантах сочетанного введения с пчелиным ядом снижает антиноцицептивное действие апитоксина. Блокада эндогенного гепарина протамином сульфатом сопровождается потенцированием ан-

тиноцицептивного действия, что косвенно доказывает участие эндогенного гепарина в нейтрализации яда. На наш взгляд в основе описанного феномена действия экзогенного и эндогенного гепарина лежит способность его вступать во взаимодействие с широким спектром биологически активных веществ, в том числе и с пчелиным ядом. За антиноцицептивный эффект в пчелином яде отвечает одна из его фракций, а именно адолапин, с которым, видимо, и взаимодействует гепарин, образуя макромолекулярное комплексное соединение.

### Заключение

Экзогенный и эндогенный гепарин модифицирует антиноцицептивные свойства пчелиного яда, увеличивая латентный период реакции облизывания лап и порог болевой чувствительности при раздражении электрическим током. Этот эффект зависит как от дозы вводимого гепарина, так и от способа сочетанного применения с ядом.

### Список литературы

1. Овчинников Ю.А. Природные токсины в изучении молекулярных основ нервной проводимости // *Фундаментальные науки – медицине*. М.: Наука, 1980. С. 60–69.
2. Орлов Б.Н., Гелашвили Д.Б. Зоотоксикология. М.: Высшая школа, 1985. 280 с.
3. Vick J.A., Shipman W.H., Brooks R.J. Beta-adrenergic and antiarrhythmic effect of cardiopep, a newly isolated substance from whole bee venom // *Toxicol.* 1974. V. 12. N 2. P. 139–144.
4. Lowy P.H., Sarmiento L., Mitchel N.K. Polipeptides minimize and melittin frjv bee venom: effects on drosophila // *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. V. 145. N 1. P. 338–343.

5. Bian R., Tian K., Yang R. Fractionation of bee venom by chromatography and its anticoagulant action // *J. Toxin. Rev.* 1990. V. 9. N 1. P. 63–67.

6. Шилова О.П., Парин С.Б. Сравнительный анализ антиноцицептивного действия некоторых зоотоксинов // *Вестник ННГУ им. Лобачевского. Сб. научных трудов аспирантов.* Н. Новгород, 1995. С. 9–12.

7. Парин С.Б., Голанов Е.В. Механизмы воздействия зоотоксинов на антиноцицептивную систему // *Механизмы действия зоотоксинов.* Межвуз. сб. Горький, 1983. С. 17–20.

8. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования БАВ. М: Медицина, 1974. 172 с.

9. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. Л.: Наука, 1975. 124 с.

10. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л: Наука, 1973. 221 с.

11. Гланц Стентон. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.

#### HEPARIN ACTION ON THE ANTINOCICEPTIVE PROPERTIES OF APITOXIN

*A.G. Butylin, M.B. Zvonkova, A.E. Khomutov, K.A. Pursanov, V.S. Slobodyanyuk*

It has been shown in the experiments on white nonpedigree male rats that exogenous and endogenous heparins injected beforehand or as an incubated mixture with apitoxin decrease substantially the antinociceptive effect of apitoxin both at spinal and supraspinal levels.

*Keywords:* heparin, apitoxin, antinociceptive properties.