

УДК 599: 539.1.047

## ВЛИЯНИЕ ПЧЕЛИНОГО ЯДА НА АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

© 2010 г.

*А.В. Дерюгина, О.А. Захарова, В.Н. Крылов*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kfg@bio.unn.ru

*Поступила в редакцию 04.02.2010*

Изучена динамика изменения электрофоретической подвижности эритроцитов и концентрации в них малонового диальдегида при внутрибрюшинном введении пчелиного яда и при иммобилизационном стрессе. Показано ограничение пчелиным ядом деструктивных изменений, развивающихся на фоне иммобилизационного стресса, за счет активации гипофизарно-надпочечниковой системы.

*Ключевые слова:* пчелиный яд, электрофоретическая подвижность эритроцитов, адаптация.

Особую актуальность на сегодняшний день приобретает проблема повышения устойчивости организма и мобилизации его резервных возможностей, и следовательно, направленный поиск эффективных и безопасных адаптогенов. Известно, что пчелиный яд, являясь естественным адаптогеном, в малых дозах обладает выраженным лечебным действием, связанным с развитием неспецифических адаптационных реакций организма [1, 2]. Ранее нами было показано, что при введении в организм пчелиного яда развивается стресс-реакция, приводящая к первоначальной активации симпатно-адреналовой системы с последующей активацией гипофизарно-надпочечниковой системы [3]. Очевидно, что активация гипофизарно-надпочечниковой системы определит повышение сопротивляемости организма к внешним стресс-факторам. Для доказательства данного утверждения необходимо изучить адаптогенное действие яда на моделях альтернирующих воздействий. В связи с указанным, целью работы было исследование действия пчелиного яда при моделировании иммобилизационно-болевого стресса у крыс. При этом анализировали наиболее значимые показатели стрессовой реакции – электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) и активность липопероксидации, оцениваемую по содержанию в них одного из ТБК-активных продуктов, образующихся в результате превращения гидроперексидей – малонового диальдегида (МДА). Известно, что ЭФПЭ позволяет оценить не только электрокинетический потенциал эритроцитов и, следовательно, морфофункциональное состояние мембран, но и является маркером гомеоста-

за организма в целом, характеризуя степень вовлечения стресс-реализующих систем [4], а концентрация МДА отражает активность ПОЛ и степень деструкции клеточных мембран.

### Материалы и методы

Исследование проведено на 40 нелинейных белых крысах-самках массой 200–250 г. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене дня и ночи. До начала эксперимента все животные прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 суток.

Крысы были разделены на 4 группы по 10 животных в группе. 1-й группе крыс состояние стресса моделировали трехчасовой иммобилизацией, создаваемой путем фиксации крыс на фанерных планшетах за 4 конечности на спине. 2-й группе животных внутрибрюшинно вводили пчелиный яд в дозе 0.1 мг/кг. В 3-й группе животным внутрибрюшинно вводили пчелиный яд (0.1 мг/кг) после их иммобилизации. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили 0.9% хлорида натрия (4-я группа).

Забор крови производили из подъязычной вены крыс до и через 15 мин, 1 час, 1 сутки и 1 неделю после воздействия. Исследовали динамику изменения ЭФПЭ и концентрации МДА в эритроцитах.

Используемые в опытах эритроциты трижды отмывали 0.85%-ным раствором хлористого натрия, центрифугируя 10 мин при 1500 об/мин.

Измерение ЭФПЭ проводили методом микроэлектрофореза [5], регистрируя время прохождения эритроцитами расстояния 10 мкм в

трис-НCl буфере с рН 7.4 при силе тока 8 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:  $U = S/TH$ , где  $S$  – расстояние, на которое перемещались клетки,  $T$  – время перемещения клеток на расстояние  $S$ ,  $H$  – градиент потенциала. Величину градиента потенциала определяли по формуле:  $H = I/g\chi$ , где  $I$  – сила тока,  $g$  – поперечное сечение камеры,  $\chi$  – удельная электропроводимость среды.

Интенсивность перекисного окисления липидов определяли по содержанию малонового диальдегида в эритроцитах. Концентрацию МДА определяли методом, основанным на способности молекулы МДА в кислой среде при температуре 90–100°C реагировать с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты с образованием окрашенного триметинового комплекса [6].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$  [7].

### Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что как иммобилизация животных, так и внутрибрюшинное введение им пчелиного яда вызывали одинаковое изменение динамики ЭФПЭ: первоначальное снижение с последующим повышением уровня данного показателя (табл. 1). При этом степень выраженности фаз зависела от вида стрессора. Так, к 15 мин регистрировалось снижение ЭФПЭ при всех исследуемых воздействиях. Однако в течение последующих 60 мин эксперимента ЭФПЭ животных после иммобилизации продолжала уменьшаться, тогда как пчелиный яд определял восстановление данного показателя до контрольных значений. Повышение ЭФПЭ регистрировалось к 1 суткам эксперимента в обеих сериях, в то же время внутрибрюшинное введение пчелиного яда определило более существенное и продолжительное повышение уровня данного показателя (1 сутки – 1 неделя на 113% – 123% относительно контрольных значений), при незначительном росте уровня ЭФПЭ у животных, подвергшихся иммобилизации (1 сутки – 7% относительно контрольных значений).

Введение пчелиного яда сразу после иммобилизации животных также вызывало типичную фазность изменения ЭФПЭ. Однако было выявлено, что введение апитоксина после иммобилизации крыс определило сокращение продолжительности протекания первой фазы ЭФПЭ, вызванной иммобилизационным стрес-

сом, и увеличило продолжительность 2-й фазы (табл. 1).

Наблюдаемые изменения ЭФПЭ опосредованы реорганизацией физико-химической структуры мембраны эритроцитов, которая во многом определяется процессами ПОЛ. Наиболее общим, интегральным показателем, характеризующим функциональное состояние мембран эритроцитов, в том числе активность ПОЛ, является концентрация МДА в эритроцитах [8].

В результате исследования установлено, что концентрация МДА к 15-ой мин эксперимента достоверно увеличивалась относительно значений контрольной группы при всех исследуемых видах воздействия. Данный факт согласуется с многочисленными исследованиями, свидетельствующими об интенсификации процессов ПОЛ при стрессе [9]. Изучение динамики концентрации МДА показало, что повышенный уровень концентрации МДА у животных, перенесших иммобилизацию, восстанавливался только к концу наблюдения (7 суток), тогда как внутрибрюшинное введение пчелиного яда определило достоверное снижение концентрации МДА уже к 1-му часу эксперимента. Таким образом, при введении пчелиного яда проявилось выраженное антиоксидантное действие апитоксина. Соответственно, введение пчелиного яда после перенесенного иммобилизационного стресса значительно понижало уровень концентрации МДА по сравнению с уровнем, регистрируемым у иммобилизованных животных (табл. 2).

Анализ полученных результатов свидетельствует, что изменение ЭФПЭ сочетается с процессами ПОЛ, что, в свою очередь, связано со стереотипной реакцией клеток на стресс. Выявленные изменения ЭФПЭ при исследуемых видах воздействия согласуются с полученными нами ранее данными для других видов стрессоров и связано с закономерными изменениями электрокинетических свойств эритроцитов в ответ на развивающуюся в организме стресс-реакцию [4].

Известно, что при стрессовых ситуациях активация симпато-адреналовой системы является первичной. Отмечено, что в реакциях на стресс концентрация адреналина в плазме возрастает в десятки раз уже через несколько минут [10], в частности при внутрибрюшинном введении пчелиного яда на 1–5 минут [11]. Путем сложной цепной реакции катехоламины стимулируют образование и поступление во внутреннюю среду гормонов коры надпочечников. В то время как катехоламины отражают возникновение срочного пускового эффекта, для кортико-

Таблица 1

**Динамика изменения электрофоретической подвижности эритроцитов крыс (мкм·см·В<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>) при различных стрессовых воздействиях**

Вид воздействия	Время воздействия			
	15 мин	1 час	1 сутки	1 неделя
Иммобилизационный стресс	1.15±0.04*	1.10±0.05*	1.45±0.07*	1.30±0.04
Пчелиный яд	1.25±0.03*	1.42±0.05	1.52±0.04*	1.58±0.03*
Иммобилизационный стресс + пчелиный яд	1.22±0.06*	1.37±0.06	1.39±0.07	1.63±0.08*
Контроль	1.33±0.04	1.39±0.04	1.35±0.01	1.28±0.05

\* –  $p < 0.05$  относительно контроля.

Таблица 2

**Динамика изменения концентрации малонового диальдегида в эритроцитах крыс (нмоль/мл) при различных стрессовых воздействиях**

Вид воздействия	Время воздействия			
	15 мин	1 час	1 сутки	1 неделя
Иммобилизационный стресс	5.41±0.12*	6.06±0.08*	4.43±0.10*	3.46±0.12
Пчелиный яд	3.71±0.07*	3.90±0.10*	3.12±0.04	3.19±0.10
Иммобилизационный стресс + пчелиный яд	5.32±0.14*	5.64±0.16*	3.56±0.14*	3.36±0.16
Контроль	3.28±0.10	4.73±0.08	3.22±0.09	3.30±0.10

\* –  $p < 0.05$  относительно контроля.

стероидов характерно долгосрочное действие [12] с максимумом увеличения через 3–6 часов [13, 14].

Регистрируемое в работе первичное уменьшение ЭФПЭ при стрессовых воздействиях связано с активацией выделения эндогенных катехоламинов, вторая фаза – повышение ЭФПЭ – определяется нарастанием в крови гормонов коры надпочечников и имеет долгосрочное действие [3]. Соответственно, действие пчелиного яда вызывает в организме развитие относительно продолжительной компенсаторной реакции (2-я фаза), приводящей к повышению резистентности организма, направленной на элиминацию патогенного стресс-фактора. Процессы ПОЛ, характеризующие функциональное состояние мембран клеток и степень их деструкции, подтверждают данное положение.

Таким образом, пчелиный яд в исследуемой концентрации вызывает развитие адапционных процессов в организме, обеспечивающих приспособление функционального состояния в условиях стрессового воздействия. Действие апитоксина приводит к активации гипофизарно-надпочечниковой системы, стимулирующей адаптивные механизмы, что проявляется в снижении деструктивных изменений, развивающихся при воздействии на организм иммобилизационного стресса.

#### Список литературы

1. Артемов Н.М. Физиологические основы действия на организм пчелиного яда. Доклад, представленный на соискание ученой степени д.б.н. Горький, 1969. 56 с.
2. Крылов В.Н., Агафонов А.В., Кривцов Н.И. и др. Теория и средства апитерапии. М.: Изд-во «Комильфо», 2007. 296 с.
3. Крылов В.Н., Густов А.В., Дерюгина А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов и стресс // Физиология человека. 1998. Т. 24. № 6. С. 108–111.
4. 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.
5. Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. Минск: Изд-во «Беларусь», 1974. 144 с.
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
8. Matteucci E., Cocci F., Pellegrini L. Erythrocyte ATP-ase enzymes family in normal people // Eur. J. Clin. Invest. 1992. № 4. P. 11.
9. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии // Успехи физиологических наук. 2004. Т. 35. № 1. С. 53–65.
10. Тюрина О.А., Кузьмин А.И., Медведев О.С. Дифференцированная активация симпа-

тической нервной системы и выброса катехоламинов при нейрогликопении у бодрствующих крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1997. Т. 124. № 11. С. 509–512.

11. Vick J.A. et al. Beta-adrenergic and antiarrhythmic effects of a compound of bee venom // Amer. bee. J. 1972. № 112. P. 288.

12. Кассиль Г.Н. Эндокринно-гуморальные аспекты физиологии спорта // Физиол. человека. 1987. Т. 13. № 2. С. 307–316.

13. Вик Дж. и др. Действие пчелиного яда и мелитина на уровень кортизола плазмы у неанестезированных обезьян // Матер. Междунар. симп. по применению продуктов пчеловодства в медицине и ветеринарии в Москве. Апимондия. Бухарест, 1972. С. 49.

14. Тавадян Д.С., Гончаров Н.П. Динамика содержания альдостерона, кортизола и его предшественников в плазме крови *M. rhesus* при длительном ограничении двигательной активности // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1980. № 12. С. 663–666.

#### APITOXIN INFLUENCE ON ADAPTIVE REACTIONS OF ERYTHROCYTES UNDER IMMOBILIZATION STRESS

*A.V. Deryugina, O.A. Zakharova, V.N. Krylov*

The dynamics of erythrocyte electrophoretic mobility and malonic dialdehyde concentration has been studied under apitoxin intraperitoneal introduction and immobilizations stress. Apitoxin has been shown to restrict the destructive changes developing against the background of immobilization stress due to the activation of the hypothysial-suprarenal system.

*Keywords:* apitoxin, erythrocyte electrophoretic mobility, adaptation.