

УДК 599: 539.1.047

## АДАПТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЧЕЛИНОГО ЯДА К ГИПОКСИИ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ

© 2010 г. *А.С. Корягин, А.Е. Мочалова, В.Н. Крылов, Л.А. Смирнова,  
Е.В. Саломатина, А.А. Николаева*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

smirnova\_la@mail.ru

Поступила в редакцию 28.01.2010

В экспериментах на крысах изучены адаптогенные эффекты пчелиного яда в составе наноконструктов при пероральном введении. Показано, что курсовое введение экспериментальным животным пчелиного яда в дозе 0.5 мг/кг в составе наноконструктов (наночастицы золота–пчелиный яд–хитозан) вызывает возникновение адаптационной реакции устойчивой активации и снижение процессов свободно-радикального окисления в условиях нормы, а также повышение резистентности к гипоксии через неделю после окончания введения препаратов, о чем свидетельствуют индикаторные показатели системы крови.

*Ключевые слова:* пчелиный яд, хитозан, наночастицы, адаптогенные эффекты, гипоксия.

### Введение

В подавляющем большинстве случаев при патологиях сердечно-сосудистой системы, лёгких, анемии, отравлениях изменяется либо доставка, либо утилизация кислорода. Классические химически синтезированные антигипоксиканты зачастую обладают симптоматическим действием и имеют серьёзные побочные эффекты. В решении указанной проблемы существенная роль отводится поиску натуральных адаптогенных средств.

Перспективным представляется использование зоо- и фитопрепаратов, в том числе зоотоксинов. Среди последних наиболее распространённым и доступным является пчелиный яд. Пчелиный яд может одновременно воздействовать на многие регуляторные и исполнительные системы организма. Выявлено, что малые дозы пчелиного яда вызывают развитие неспецифической адаптационной реакции активации и оказывают радиозащитное действие при курсовом внутрибрюшинном введении [1]. Необходимо отметить, что исследований по изучению адаптогенных эффектов пчелиного яда к условиям действия других экологических неблагоприятных факторов, в частности вызывающих развитие гипоксии, практически не проводилось.

Однако высокая аллергенная и антигенная активность пчелиного яда ограничивает его инъекционное применение в практической медицине. В свете этого предпочтительным методом применения препаратов зоотоксинов явля-

ется пероральный. Поскольку яд пчелы имеет белково-пептидную природу и способен разрушаться протеазами пищеварительного тракта, его введение *per' os* в организм малоэффективно. Для решения проблемы защиты зоотоксина от разрушения протеазами и транспорта его через слизистую кишечника авторами были разработаны наносистемы (далее будем называть их нанопрепаратами), содержащие наночастицы золота и пчелиный яд, стабилизированные хитозаном.

Цель настоящей работы – исследование адаптогенной активности пчелиного яда в составе нанопрепарата в условиях нормы и гипоксии при пероральном применении.

### Материалы и методы

В работе использовали хитозан со среднечисловой молекулярной массой  $1.3 \times 10^5$  и степенью деацетилирования 80%, пчелиный яд  $-DL_{50} = 8-10$  мг/кг. Средний размер наночастиц золота в нанопрепарате составлял 8–10 нм.

Работа выполнена на беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, выращенных в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и естественном чередовании суточной освещённости.

В первой серии экспериментов определяли тип адаптационной реакции при курсовом пероральном введении пчелиного яда в составе наночастиц золота, стабилизированных хитозаном в условиях нормы. Животные были разделены на 4 группы по 7 особей в каждой. В пер-

Таблица 1

**Содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула в крови крыс через 7 суток после окончания перорального введения препаратов пчелиного яда в условиях нормы**

Показатель	Интактные	Контроль (хитозан + Au)	Опыт (хитозан + Au + пчел. яд 0.5 мг/кг)	Опыт (хитозан + Au + пчел. яд 1.0 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л	13.48 $\pm$ 1.69	14.16 $\pm$ 1.29	10.96 $\pm$ 0.44	13.32 $\pm$ 2.01
Сегментоядерные нейтрофилы, %	18.34 $\pm$ 0.80	22.20 $\pm$ 1.51*	13.60 $\pm$ 0.38*#	17.34 $\pm$ 1.65#+
Лимфоциты, %	74.66 $\pm$ 0.31	74.08 $\pm$ 1.65	82.64 $\pm$ 0.74*#	79.78 $\pm$ 2.01*#
Лейкоцитарный коэффициент	4.09 $\pm$ 0.17	3.42 $\pm$ 0.33	6.11 $\pm$ 0.23*#	4.85 $\pm$ 0.61#+

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* –  $p < 0.05$  по отношению к интактным; # –  $p < 0.05$  по отношению к контролю, + –  $p < 0.05$  по отношению к 1-ой опытной группе.

вую вошли интактные животные (условная норма), во вторую – крысы, которым вводили наночастицы золота, стабилизированные хитозаном (в дозе золото – 0.5 мг/кг, хитозан – 100 мг/кг), животные третьей и четвертой групп получали нанопрепараты, содержащие пчелиный яд в дозе 0.5 и 1.0 мг/кг соответственно. Препараты вводили при помощи зонда в объеме 1 мл на животное в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. Кровь для анализа забирали из подъязычной вены на 1-е и 7-е сутки после введения препаратов. Определяли количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу [2], лейкоцитарный коэффициент (отношение процентного содержания лимфоцитов к процентному содержанию сегментоядерных нейтрофилов) [3]. Методом индуцированной биофлюоресценции в плазме крови определяли интенсивность свободнорадикального окисления [4] по показателю светосуммы S.

Во второй серии экспериментов исследовали возникновение резистентности животных к гипобарической гипоксии при предварительном курсовом введении нанопрепаратов. Животные были разделены на 4 группы: первая группа – интактные животные, вторая – контроль на гипоксию (препаратов не получали), третья – получали препарат наночастиц золота с хитозаном, четвертая – наночастицы золота с хитозаном и пчелиным ядом в дозе 0.5 мг/кг. Условия введения нанопрепаратов аналогичны описанным для предыдущей серии. На 7-е сутки после введения препаратов животных 2–4 групп подвергали воздействию гипобарической гипоксии (условная высота 8 тыс. метров над уровнем моря) в течение 30 мин. Анализ крови проводили на следующий день после экспозиции в барокамере. В крови, кроме показателей предыдущей серии, определяли концентрацию гемоглобина [2] и активность лактатдегидрогеназы [5].

Результаты исследований статистически обрабатывали с помощью программы *BIOSTAT*. Независимые выборки сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, непараметрических критериев Крускала–Уоллиса и Ньюмена–Кейлса.

### Результаты и их обсуждение

Было исследовано действие двух доз пчелиного яда в составе нанопрепаратов: 0.5 и 1.0 мг/кг массы животного в условиях нормы. Анализ параметров крови (количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, лейкоцитарный коэффициент) и интенсивности свободнорадикального окисления (значение светосуммы S) через сутки после окончания перорального введения нанопрепаратов не выявил формирования существенной реакции адаптации. Поэтому был увеличен временной интервал и проведено исследование тех же показателей через неделю после окончания введения нанопрепаратов, содержащих пчелиный яд.

Изучение показателей крови через 7 суток после окончания введения препарата в условиях нормы показало, что содержание лейкоцитов в данном эксперименте в исследуемых группах сохранялось на уровне интактных животных (табл. 1).

В контрольной группе наблюдалось статистически значимое увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов на 21%, а количество лейкоцитов при этом и значение лейкоцитарного коэффициента не отличались от уровня интактных крыс. Это свидетельствует об отсутствии явно выраженной ответной реакции на препарат, не содержащий пчелиный яд. Вероятно, у крыс контрольной группы формируется неспецифическая реакция тренировки. В обеих опытных группах количество лимфоцитов ста-

Таблица 2

**Содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула в крови крыс при моделировании гипобарической гипоксии через неделю после окончания перорального введения нанопрепаратов, содержащих пчелиный яд**

Показатель	Интактные	Контроль (гипоксия)	Контроль (гипоксия + хитозан + Au)	Опыт (гипоксия + хитозан + Au + пчел. яд 0.5 мг/кг)
Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л	16.65±1.14	27.60±2.41*	28.44±3.95*	28.44±1.71*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	12.75±0.92	22.50±2.07*	16.17±1.17	12.50±1.17#+
Лимфоциты, %	73.50±2.13	57.50±4.15*	64.70±2.97	69.30±3.11#
Лейкоцитарный коэффициент	6.01±0.68	2.56±0.21*	4.00±0.24*	5.80±0.69#+

*Примечание:* статистически значимые отличия: \* –  $p < 0.05$  по отношению к интактным; # –  $p < 0.05$  по отношению к контролю (гипоксия); + –  $p < 0.05$  по отношению к контролю (гипоксия + хитозан + Au).

статистически значимо увеличивалось соответственно на 11% и 7%, а относительное содержание сегментоядерных нейтрофилов уменьшалось только в опытной группе при дозе пчелиного яда 0.5 мг/кг на 26% относительно интактных животных ( $p < 0.05$ ). Лейкоцитарный коэффициент статистически значимо повышался в данной опытной группе на 49% относительно исходного показателя ( $p < 0.05$ ). Во второй опытной группе (1.0 мг/кг) количество сегментоядерных нейтрофилов оставалось на уровне интактных крыс, а также наблюдалась тенденция к увеличению лейкоцитарного коэффициента. Относительное содержание других форм лейкоцитов варьировалось незначительно.

Анализ активности процессов свободнорадикального окисления выявил, что через 7 суток после окончания введения препаратов не наблюдалось статистически значимого изменения показателей светосуммы S (имп/30сек) относительно интактных, в то время как в опытных группах наблюдалось статистически значимое снижение активности процессов (106.8 – интактные, 102.1 – контроль, 91.6 и 91.4 – опыт при дозе пчелиного яда 0.5 и 1.0 мг/кг соответственно).

Таким образом, состояние устойчивой активации организма формируется через неделю после окончания перорального введения нанопрепаратов при дозе пчелиного яда 0.5 мг/кг. Доза 1.0 мг/кг вызывает менее физиологичную реакцию активации с признаками напряженности.

В следующей серии опытов исследовались адаптационные эффекты пчелиного яда в составе нанопрепаратов в условиях гипоксии спустя 7 суток после окончания введения препаратов. Во всех группах животных в крови одинаково повышалось количество лейкоцитов по сравнению с интактными животными (табл. 2), что

свидетельствует о реакции организма на гипоксическое повреждение. Лейкоцитарная формула выявила лимфопению и сегментоядерный нейтрофилез, а также снижение значения лейкоцитарного коэффициента ( $p < 0.05$ ) в обеих контрольных группах на гипоксию относительно интактных, что свидетельствует о стресс-реакции. В опытной группе количество лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, лейкоцитарный коэффициент оставались на уровне интактных животных. Это свидетельствует об отсутствии стресс-реакции в опытной группе животных и о формировании резистентности к гипоксии.

Обращает на себя внимание статистически значимое повышение гемоглобина в контрольных группах по сравнению с интактными животными, в то время как в опытной группе содержание гемоглобина было ниже ( $p < 0.05$ ). Это дополнительно подтверждает резистентность к гипоксии животных, получавших пчелиный яд (рис. 1).

Существенному изменению при гипоксии подвергается активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови. Активность ЛДГ в контрольной группе («гипоксия») увеличивалась на 48% ( $p < 0.05$ ) (рис. 2). Нарушение метаболизма углеводов, а именно резкое его усиление по пути анаэробного гликолиза, помимо снижения количества синтезируемой АТФ, приводит к накоплению молочной кислоты. Снижение активности фермента ЛДГ при гипобарической гипоксии в контрольной «хитозан + золото» и опытной «хитозан + золото + пчелиный яд» группах свидетельствует о переключении метаболизма по пути аэробного окисления пирувата в условиях дефицита кислорода и подтверждает ранее выявленные адаптогенные эффекты хитозана [6].

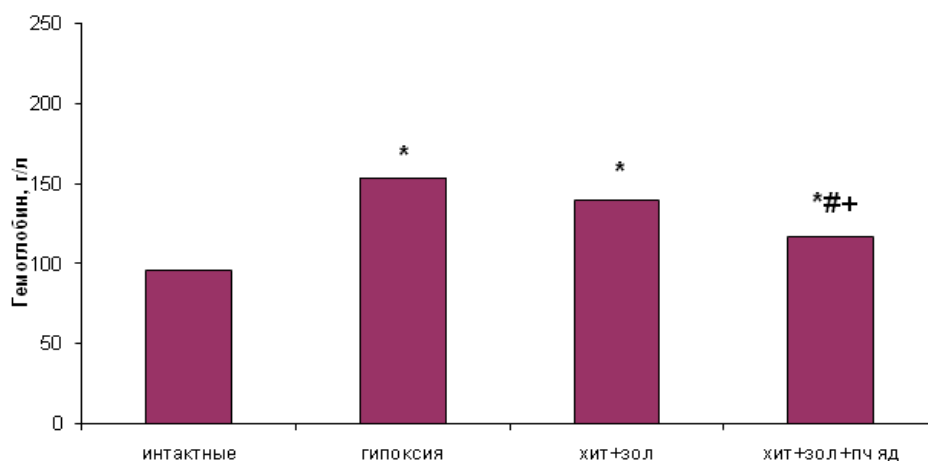


Рис. 1. Содержание гемоглобина (г/л) в периферической крови крыс при моделировании гипобарической гипоксии через 7 дней после окончания перорального введения нанопрепаратов, содержащих пчелиный яд. Статистически значимые отличия: \* –  $p < 0.05$  по отношению к интактным; # –  $p < 0.05$  по отношению к группе «гипоксия»; + –  $p < 0.05$  по отношению к контролю

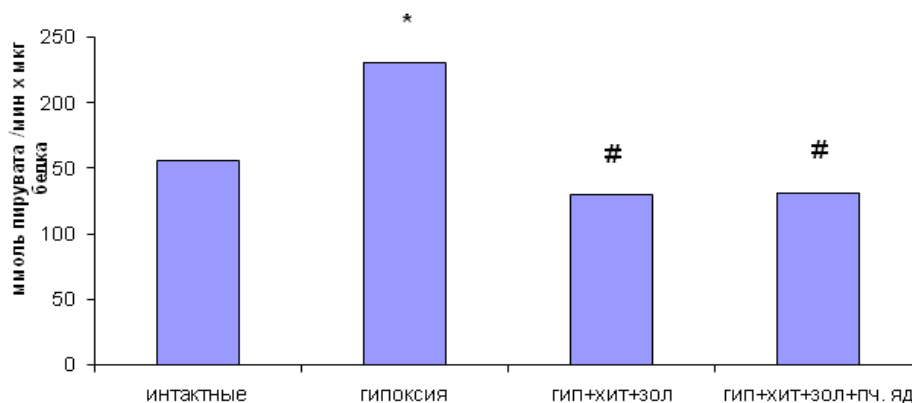


Рис. 2. Активность ЛДГ (ммоль пирувата/мин · мг белка) в плазме крыс через неделю после курсового перорального введения нанопрепаратов в условиях барометрической гипоксии. Статистически значимые отличия: \* –  $p < 0.05$  по отношению к интактным; # –  $p < 0.05$  по отношению к группе «гипоксия»

Таким образом, проведенные исследования показывают, что пчелиный яд в составе нанопрепарата (наночастицы золота–пчелиный яд–хитозан) не подвергается протеолитическому расщеплению ферментами желудочно-кишечного тракта, транспортируется через слизистую кишечника в кровь и приводит к формированию адаптационной реакции стойкой активации в условиях нормы и резистентности к гипоксии. Состояние резистентности наблюдается спустя неделю после окончания курсового введения препарата с оптимальной дозой зоотоксина 0.5 мг/кг. Это служит свидетельством перспективности создания препаратов биологически активных веществ белковой природы с использованием нанотехнологий для применения *per'os*.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-02-97031-р\_поволжье\_а).*

#### Список литературы

1. Корягин А.С., Крылов В.Н., Ерофеева Е.А. // Журн. эволюционной биохимии и физиолог. 2008. Т. 44. № 4. С. 424–428.
2. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. 368 с.
3. Шихлярова А.И., Гаркави Л.Х., Квакина Е.В., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакции активации как путь к оздоровлению через процессы самоорганизации. Екатеринбург: Филантроп, 2002. 196 с.

4. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах // Межвуз. сб.: Биохимия и биофизика микроорганизмов. Горький, 1983. С. 179–183.
5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1971. С. 114–115.
6. Корягин А.С., Ерофеева Е.А., Якимович Н.О., Александрова Е.А. и др. // Бюлл. экспер. биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 10. С. 444–446.

#### APITOXIN ADAPTOGENIC EFFECTS TO HYPOXIA AFTER PERORAL ADMINISTRATION

*A.S. Koryagin, A.E. Mochalova, V.N. Krylov, L.A. Smirnova, E.V. Salomatina, A.A. Nikolaeva*

Adaptogenic effects of apitoxin in nanocomposite formulation after peroral administration have been studied on rats. The peroral administration of apitoxin in nanocomposites (gold nanoparticles-apitoxin-chitosan) to experimental animals in a dose of 0.5 mg/kg brings about the adaptation reaction of sustained activation and the reduction of free-radical oxidation processes under normal conditions, as well as an increased resistance to hypoxia in a week after the end of preparation administration that has been confirmed by the blood system indices.

*Keywords:* bee venom, apitoxin, chitosan, nanoparticles, adaptogenic effects, hypoxia.