

REZUMAT

Teza intitulată “**Dinamica unor indici biochimici sangvini la mamifere în intoxicația cu venin de albine**“ are la baza un studiu original efectuat pe loturi de animale de laborator injectate cu doze variate de venin de albine, urmărindu-se modificările produse la nivelul principalelor organe și țesuturi din organismul animal, creând premisele extrapolării acestor rezultate pentru viitoarele terapii de medicina veterinară și medicina umană.

Teza cuprinde un număr de 247 pagini, structurată în două părți:

Partea I – stadiul actual al cunoașterii ce cuprinde un număr de 83 pagini, compusă din trei capitole conținând considerații generale despre veninul de albine din punct de vedere biochimic și toxicologic. În această parte s-au folosit date din literatura de specialitate, câteva date despre parametrii biochimici sangvini la mamifere și implicațiile lor fiziopatologice precum și toxicitatea veninului de albine la mamifere, cu prezența diverselor mecanisme fiziopatologice.

Partea II – reprezentând cercetarea propriu zisă, este partea personală structurată deasemenea pe trei capitole, cuprinde scopul lucrării cu prezentarea materialelor și metodelor de cercetare, un capitol dedicat rezultatelor și discuțiilor în urma inoculării de doze succesive la animalele luate în studiu și un ultim capitol care conține concluziile generale ale cercetărilor efectuate.

Datele prezentate în această lucrare sunt susținute de un număr de 47 tabele și 117 figuri, reprezentări grafice plus imagini de anatomie-patologică inserate la nivelul capitolului II, reprezentând adevărate dovezi ale originalității lucrării de față.

Bibliografia prezentă în finalul lucrării însumează 159 titluri din literatura romană și străină, precum și pagini electronice ale diverselor reviste și lucrări de specialitate care fac referire la tema aleasă.

Deasemenea bibliografia cuprinde legislație specifică în domeniul toxicologiei, standarde ale unor metode de lucru, precum și titluri ale unor lucrări proprii, susținute la diverse simpozioane ale Facultăților de Zootehnie și Medicină Veterinară, una din lucrări fiind chiar recompensată cu premiul I în 2011.

Originalitatea tezei consta în relevarea efectului toxic al veninului de albine asupra organismului mamiferelor în funcție de doza administrată.

Numeroasele cercetări efectuate până în prezent, arată că veninul de albine are o structură complexă, în el fiind prezente atât substanțe de natură organică cât și anorganică, substanțe ce-i conferă proprietăți particulare, specifice.

Veninul de albine este un produs secretat de glandele de venin și eliminat de către albinele lucrătoare sub acțiunea unor stimuli externi. În momentul eliminării din vezicula aparatului de apărare al albinei, veninul se prezintă ca un lichid incolor, dens. În contact cu aerul se solidifică repede și se eliberează de componenții săi volatili. Prin răzuirea veninului de albine cristalizat de pe placa colectoare, acesta devine o pulbere afinată de culoare alb mat - ușor cenușie. Veninul de albine este termorezistent, temperatura scăzută sau cea ridicată nedistrugând însușirile lui. Sub formă uscată poate fi păstrat timp îndelungat fără a-și pierde proprietățile toxice. Este rezistent în acțiunea acizilor și a bazelor. Datorită compoziției chimice complexe veninul de albine are o acțiune biologică bine determinată, constituind o importantă sursă de substanțe active pentru produsele apiterapeutice. Veninul de albine conține mai mult de 40 substanțe active, multe cu efecte biologice. Cel mai relevant este un antiinflamator numit melitina. Această substanță face să se producă hormonul cortizol. Întrucât este un antiinflamator, studiile comparative au arătat că melitina este de 100 de ori mai puternic decât hidrocortizonul. De aceea veninul de albine poate fi necesar în tratarea bolilor cu caracter inflamator precum artrita reumatoidă.

Alți compuși ce pot avea efect farmacologic includ: apamina, ce are ca efect întărirea rețelei de căi nervoase; adolapina, un antiinflamator și analgezic; norepinefrina, dopamina și seratonina cu efect în depresii.

Apicultorii, ce folosesc întreaga gamă de produse apicole, sunt persoanele cu cea mai ridicată medie de viață (după categoria profesională a dirijorilor de orchestră) și la care rar sunt semnalate cazuri de cancer, este categoria socio-profesională cea mai plină de energie și sănătate.

În literatura de specialitate se apreciază că dintre compușii evidențiați până în prezent în veninul de albină (VA), cei majori sunt reprezentați de către histamină, catecholamine, poliamine, apamină, melitină și fosfolipază .

Veninul de albine este compus din proteine, enzime, hormoni, săruri minerale, uleiuri eterice și alte substanțe volatile. Principalul component al veninului de albine îl reprezintă substanțele proteice în a căror structură există trei fracții. Cea mai importantă fracție proteică este melitina, aceasta fiind considerată și componenta cea mai activă a veninului. În melitină s-au identificat glicocol, alanină, valină, leucină, izoleucină, serină, tirozină, lizină, arginină, asparagină, glutamină, triptofan, prolină. Această fracție a veninului este hemolitică,

degajează histamină și serotonină, scurtează fibrele musculare netede și striate, scade presiunea sanguină și ritmul respirator, blochează sinapsele nervoase periferice și centrale etc. Are reacție alcalină, cu pH-ul de 11,0. O altă fracție bine reprezentată este cea alcătuită din fermentii hialuronidazei și fosfolipazei A în fosfolipază, care are pH-ul 10.

Natura complexă a veninului trebuie pusă pe seama mării diversități de insecte și vertebrate prădătoare care pot ataca familia de albine. La om reacțiile la picătura de venin sunt de trei feluri: locale, sistemice și anafilactice. În primul caz de reacție, umflătura locală se extinde în timp de câteva ore, iar locul înțepat poate fi roșu, cald și sensibil 2-3 zile. O reacție sistemică se petrece în câteva minute după înțepătură și poate provoca o erupție generală, tulburări respiratorii, greață, vomismente, dureri abdominale și sincope.

În reacția anafilactică, simptomele se manifestă în câteva secunde după înțepare și comportă dificultăți respiratorii, confuzii mentale, vomismente, un șoc de tensiune sanguină care poate conduce la pierderea cunoștinței; și la moartea prin colaps respirator și circulator. În general se poate crea o oarecare rezistență la înțepăturile albinelor dar totuși, reacțiile la acestea pot deveni pe neașteptate, dintr-o cauză sau alta, foarte intense. Cei care sunt foarte sensibili pot muri dintr-o singură înțepătură de albină, dar un om a înregistrat 2243 de înțepături și a supraviețuit.

Din punct de vedere toxicologic, veninul de albine are o acțiune directă - toxicitatea celulară (care duce la destructurarea celulelor) și o acțiune indirectă - manifestări imunologice. Aceasta, datorită compoziției chimice care este foarte complexă și conține enzime, peptide, amine, acizi aminați și alte substanțe care pot fi alergeni puternici pentru organism.

Din punct de vedere fiziologic toate acțiunile veninului de albine sunt toxice. Toxicitatea veninului de albine este dată de glanda veninoasă mare a albinei. În urma înțepăturii, inflamarea se datorează histaminei din venin. Nu există vaccin împotriva veninului de albine. Anumiți cercetători consideră ca antidot al vaccinului de albine soluția apoasă de propolis, stabilizată și standardizată - Propolis H4. În afara utilizării sale intenționate și supravagheate medical, veninul de albine trebuie evitat.

S-au semnalat următoarele acțiuni ale veninului de albine:

1. hemolitică (produce distrugerea globulelor roșii);
2. hemoragică (produce ieșirea sângelui din vas);
3. neurotoxică.

S-a dovedit că veninul albinelor are proprietăți antiinflamatoare. Acțiunea terapeutică a veninului se datorează conținutului de melitină, o substanță cu proprietăți antiinflamatoare. Melitina stimulează secreția de către organism a unui hormon antiinflamator, cortizolul. În

același timp, melitina are proprietăți antibacteriene, stimulează producerea de anticorpi și imunitatea organismului, îmbunătățește microcirculația.

Scopul tezei de doctorat constă în urmărirea evoluției unor constante biochimice sangvine și hematologice la șobolanii și iepurii inoculați cu venin de albine. Experimentul reprezintă un mijloc de stabilire a corelației între intoxicația cu venin de albine și modificarea constantelor biochimice sangvine la mamifere. Cercetarea precede testările clinice și este bazată aproape în totalitate pe teorie și experimentele pe animale.

Evoluția valorilor constantelor biochimice ale sângelui unor specii de mamifere (șobolani și iepuri), poate reflecta tendința respectivelor constante în intoxicația cu venin de albine pentru toate mamiferele.

În cadrul acestei teze doctorale modelul experimental prezentat reprezintă mijlocul pentru a stabili corelația între intoxicația cu venin de albine și modificarea constantelor biochimice sangvine, aceasta fiind ipoteza particulară de lucru pentru acest experiment.

În afară de efectul toxic, inflamator, alergic, veninul are efect terapeutic. Actualmente a câștigat popularitate medicina alternativă, inclusiv terapia cu venin de albine, datorită numeroaselor rapoarte de cercetare care au evidențiat efectele sale benefice.

Aceste proprietăți controversate atribuite veninului de albine (anafilaxia, edemul angioneurotic, cardiotoxic, nefrotoxic, hemolitic dar și efectele imunomodulatoare, antimutagene, antitumorale, antiinflamatoare și antinociceptive) ne-au condus la inițierea studiului.

Consecvenți scopului propus, urmărim dinamica modificării indicatorilor biochimici sanguini la administrarea unor doze subletale variabile de venin de albine și variația răspunsului organismului mamifer la veninul de albine dependent de doza și timpul de acțiune.

De asemenea prezintă interes și evoluția valorilor hematologice, la fiecare recoltare făcându-se și o hemoleucogramă completă.

La șobolanii inoculați cu venin de albine în variate doze (0,3; 0,6; 1,2 mg) am constatat următoarele:

- creșterea semnificativă statistic a numărului de hematii proporțional cu doza inoculată, de la $6,22$ la $8,60 \times 10^6/\mu\text{l}$ după 6 ore.

De asemenea hemoglobina crește de la $10,26$ g/dl la $13,75$ g/dl după 9 h.

Se produce o hemoconcentrație semnificativă tradusă prin creșterea numărului de hematii și a hematocritului. Apoi are loc hemoliza cu eliberarea hemoglobinei.

➤ creșterea simultană a numărului de leucocite de asemenea proporțional cu doza inoculată; în primele 6 ore de la inoculare numărul de leucocite aproape se dublează, de la 3,5 la 6,5 x 10³/μl.

➤ proteinele totale au avut o evoluție sincronă cu granulocitele.

Din studiul dinamicii majorității parametrilor luați în studiu (eritrocite, CHEM, creatinină, proteinele totale, AST, ALT), se remarcă existența a două „subfaze” de evoluție fiziologică:

➤ subfaza de **hemoconcentrație**;

➤ subfaza **hemolitică**.

În prima fază se constată o creștere o dată cu hemoconcentrația urmând ca în faza a doua să intervină probabil reacții de aparare-compensare, respectiv procese de reparare tisulară.

Dinamica proteinelor la iepurii inoculați cu doze variabile de venin de albine și recoltare periodică a probelor biologice, arată o scădere treptată a proteinemiei în primele 6 ore indiferent de doza de venin inoculată de la 6,90 g/dl la 5,70 g/dl la lotul E1 (scăderea cea mai mare) urmată de o revenire treptată la valorile inițiale.

În ceea ce privește *evoluția fosfatazei alcaline* (PAL) se observă o creștere progresivă, de la 210,5 la 504,6 la 9 ore după inoculare cu 0,1 mg venin albină.

Evoluția transaminazelor serice. Remarcăm diferențe net semnificative și o creștere constantă în ceea ce privește nivelul seric al indicatorilor AST, ALT, creatinină și uree urmată de o tendință de scădere a valorilor la 9 ore de la inoculare.

Creatinina, proteinele totale, AST și ALT înregistrează o creștere progresivă a valorilor în primele 6 ore, urmată de o scădere constantă după acest interval. CHEM scade în prima subfază, pentru ca apoi să revină progresiv la valorile normale. Albumina, ureea, fosfataza alcalină și amilaza înregistrează o creștere constantă până la 24 ore de la inocularea inițială.

Analizând *evoluția colesterolului* se înregistrează o scădere a valorilor până la 6 ore de la 156,2 la 95,4 mg/dl la lotul E1 (scăderea cea mai accentuată) urmată de o revenire accentuată la doza de 0,3 mg venin și o revenire treptată a valorilor inițiale la inocularea cu 0,6 și 0,12 mg venin de albină.

Variațiile glicemiei la toate loturile experimentale sunt în limite fiziologice de referință, în timp ce variațiile indicatorilor metabolismului lipidic sunt extrem de oscilante.

Lipoproteinele HDL, LDL, VLDL și chilomicronii sunt modificate de 2 enzime plasmatiche: lecitin-colesterol aciltransferază, cu activitate fosfolipazică A2 și lipoproteinlipaza. S-a demonstrat că fosfolipazele A2 din veninuri au activitate enzimatică de 3 ori mai mare decât lecitin-colesterol aciltransferaza plasmatică.

Creatinina s-a menținut în limite normale și a variat nesemnificativ la lotul E2, în timp ce la lotul E3 am remarcat o scădere sub limita inferioară de referință la 6 ore de la inoculare, cu o revenire către limita inferioară la 24 de ore.

Ureea a crescut ușor la T1 și T2 față de T0, valorile depășind limita superioară de referință, urmând ca la 24 de ore să înregistreze o reducere semnificativă până în limitele valorilor de referință.

La **iepurii** luați în studiu, inoculați cu aceleași doze de venin, am constatat modificarea următorilor parametri biologici:

-creșterea glicemiei (fără a depăși limitele de referință ale speciei) la doze de 0,3 mg per animal, începând cu 6 ore de la inoculare, în timp ce la doze de 0,6 mg și 1,2 mg per animal, creșterea a apărut la 2 ore de la inoculare, cu revenire la valorile inițiale după 24 de ore. Creșterea nesemnificativă și tranzitorie a glicemiei se datorează efectului adrenergic și corticosteroidic indus de substanța inoculată.

-fosfolipaza A2 din veninul de albine a determinat la iepurii luați în studiu o reducere semnificativă a colesterolemiei și trigliceridemiei, relevantă la 2 și 6 ore de la inoculare, cu revenire la valorile inițiale la 24 de ore. Efectul este rezultatul coroborat al acțiunii enzimatică asupra lipoproteinelor plasmatice și a preluării trigliceridelor în țesutul adipos.

Această acțiune favorabilă pentru organism ar merita speculată în vederea valorificării efectului terapeutic al veninului de albine în tratamentul dislipidemiilor.

Inocularea dozelor de 0,3 mg de venin de albine per individ la iepurii luați în studiu a evidențiat creșterea progresivă a nivelului seric al transaminazelor (ALT și AST) și al ureei, demonstrându-se astfel instalarea insidioasă, lentă a stării de hepatotoxicitate și disfuncție renală, chiar la doze mici de venin.

Inocularea dozelor de 0,6 și 1,2 mg venin de albine per iepure a evidențiat creșterea imediată, la 2-6 ore a transaminazelor serice (AST și ALT) cu revenire după 24 de ore, dar și o creștere a PAL la 24 de ore de la inoculare, modificări care indică instalarea unor leziuni hepato-celulare reversibile (rămâne de clarificat dacă originea creșterii PAL este leziunea colangiocelulară sau secundar stimulării corticosuprarenale).

Creșterea rapidă a nivelului seric al ureei la doze de 0,6 și 1,2 mg venin per iepure, apoi revenirea la valori normale după 24 de ore, evidențiază disfuncția renală acută cauzată de reducerea tranzitorie a fluxului renal sanguin, urmată de declanșarea unor mecanisme compensatorii de restabilire a homeostaziei la nivel celular.

Modificările anatomopatologice survenite la șobolani după 9 ore de la inoculare:

La nivelul ficatului s-a observat spațiu port cu congestie vasculară și dilatarea canaliculelor biliare; limfocite și hematii în sinusoidale; nuclei hepatocitari mari cu cromatină condensată; binucleere; stază în venele centrolobulare și sinusoidale perivasculare; microtromboze sinusoidale; hepatocitoliză în zona centrolobulară; stază în venula spațiului porto-biliar; degenerescență hidropică a hepatocitelor; hipertrofia celulelor Kupfer.

În miocard s-au observat: hematii aderente la endoteliul vascular; tromboze; hemoragie interstițială; miocitoliză; limfocitoză interstițială; leziuni distrofice.

În rinichi am constatat: congestia capilarelor glomerulare; hipertrofie glomerulară cu pensarea capsulei Bowman; microtromboze vasculare, hemoragie interstițială; tubulonecroză; cilindri hialini; stază arterială cu hipertrofia mediei.

La nivelul mușchilor striați s-a evidențiat: miocitoliză; inflamatie interstițială; hemoragie interstițială.

În splină s-au observat: hiperplazia pulpei albe; tromboze vasculare; sinusoidale dilatate; limfocitoză sinusoidală.

În pulmon s-au evidențiat: tromboză; reacție inflamatorie monocitară interstițială; congestie și stază vasculară.

Leziunile histologice observate concordă cu datele analizelor biochimice confirmând acțiunea toxică foarte complexă a veninului de albine în experiment acut, tradusă prin tulburări circulatorii, inflamatorii și degenerative la nivel hepatic, renal, pulmonar și miocardic. Acestea nu exclud acțiunea terapeutică a veninului ci sugerează prudență în evaluarea clinică a pacienților, întrucât modificările circulatorii pro- și antiinflamatorii pot fi exploatate în scop medical.