

На правах рукописи

УЛИТИН Игорь Борисович

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА И ИХ ПРЕПАРАТОВ НА
НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА
В НОРМЕ И ПРИ АЛЬТЕРАЦИИ ФУНКЦИЙ

03.03.01 – физиология

03.01.04 - биохимия

Автореферат
диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2010

Работа выполнена в Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского – Национальном исследовательском университете

Научные руководители:

Доктор биологических наук,
профессор Крылов Василий Николаевич
Доктор медицинских наук,
профессор Добротина Наталия Аркадьевна

Официальные оппоненты:

д.б.н, доц. Романова Елена Борисовна
д.м.н, проф. Курников Георгий Юрьевич

Ведущая организация:

ГОУ ВПО «Нижегородский государственный педагогический университет»

Защита состоится «15» апреля 2010 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И.Лобачевского (603950, Нижний Новгород, пр.Гагарина, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета

Автореферат разослан «_____» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н., доцент

Копылова С.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Необходимость поиска новых эффективных методов и средств профилактики и сохранения здоровья, а также лечения различных заболеваний человека определяется частой неэффективностью, а также побочными явлениями и осложнениями, нередко наблюдаемыми при терапии синтетическими препаратами. Поэтому все более актуальными являются исследования физиологической активности и внедрения в практику природных соединений. Одним из таких направлений является апитерапия, т.е. лечение заболеваний человека пчелоужалениями и продуктами пчеловодства – медом, прополисом, маточным молочком, пыльцой, пергой, воском, пчелиным ядом (Лудянский, 1994; Крылов и др., 2007; Chen et al., 1993 Popescu, 1997; Goker et al., 2005).

Продукты пчеловодства, прежде всего пчелиный яд, обладают целым рядом физиологических свойств: полифункциональностью, противомикробным, биостимулирующим, противовоспалительным, анестезирующим, радиопротекторным и др. (Вахонина, 1992; Крылов, Сокольский, 2000). Вместе с тем, наряду с широким применением в апитерапии пчелиного яда, в гораздо меньшей степени используются такие высокоактивные продукты, как прополис и маточное молочко пчел. Это объясняется, с одной стороны их меньшей изученностью, а с другой – сложностью введения в организм, т.к. они имеют сложный, многокомпонентный состав (Поправко, 2000). Прежде всего, это связано с их различным отношением к растворимости. Часть веществ растворимы в воде и образуют истинные растворы, доступные для поступления в организм, другая часть веществ растворяется только в высококонцентрированных растворителях (например, флавоноиды прополиса и жирные кислоты маточного молочка) и не может быть непосредственно применена для парентерального введения в организм.

Анализ применяемых лекарственных форм показал, что для введения аналогичных соединений в организм наиболее приемлема аэрозольная форма введения, с неразрушающим способом создания аэрозоля ультразвуковым методом (Комарова, Егорова, 1994).

Известно, что лекарственное вещество в виде аэрозоля при его вдыхании оказывает воздействие на большую поверхность слизистой оболочки бронхов и бронхиол, что создает условия увеличенной активности лекарства и, соответственно, быстрому развитию фармакологического эффекта. При этом препарат в неизменном виде непосредственно поступает к тем тканям, где он должен оказать максимальное воздействие – слизистым оболочкам дыхательных путей и альвеол. Кроме того, легко всасываясь через слизистые и попадая в кровоток, лекарственный препарат оказывает на больной организм и общее действие, не подвергаясь

инактивации в печени в первую волну циркуляции. Указанные эффекты пчелопродуктов были подтверждены ранее С.В. Горелой (1999) на моделях гипоксии, а также ожоговых больных.

Мы полагаем, ингаляционная апитерапия может быть наиболее эффективна при заболеваниях легких - верхних дыхательных путей, острых бронхолегочных заболеваниях, хронических неспецифических заболеваниях легких, бронхиальной астме, туберкулезе легких. Однако для обоснования апитерапии этих заболеваний необходимо изучить механизмы корригирующего действия как прополиса, так и маточного молочка, а также их препаратов при таком способе введения. Вышеизложенное послужило обоснованием выбора цели диссертации. Работа проводилась в рамках плановых НИР кафедры физиологии и биохимии человека и животных (№ Госрегистрации 81062913, программа «Университеты России» – биология) и кафедры молекулярной биологии и иммунологии.

Целью работы явилось изучение влияния пчелиного маточного молочка, прополиса и их комбинации на некоторые показатели резистентности организма человека и животных в норме и при альтерации функций.

Для достижения указанной цели решались **следующие задачи**:

1. изучить влияние продуктов пчеловодства и их препаратов на иммунологические показатели крови **in vitro**:
 - определение физиологических и цитотоксических концентраций препаратов при действии на систему мононуклеаров крови человека;
 - влияние на адгезивные свойства иммунокомпетентных клеток крови;
 - влияние на розеткообразование выделенных Т-лимфоцитов;
 - влияние на комплементарную активность в условиях модельной сывороточной системы морских свинок;
2. исследовать влияние продуктов пчеловодства на изолированную трахею крыс;
3. проанализировать изменение показателей крови при ингаляции препаратов животным в условиях моделирования лучевой болезни у крыс;
4. изучить изменение функции внешнего дыхания и иммунного статуса больных ХНЗЛ при включении прополиса и маточного молочка в комплекс терапевтических мероприятий.

Научная новизна

Впервые в условиях *in vitro* установлено модулирующее влияние пчелиного маточного молочка, прополиса и их комплекса на пул лимфоцитов. Впервые в условиях изолированной трахеи крыс выявлено непосредственное бронхорасширяющее действие смеси прополиса и маточного молочка. В условиях моделирования лучевой болезни у крыс показано, что комплекс маточного молочка и прополиса обладает более

выраженным радиопротекторным действием по сравнению с отдельными продуктами пчеловодства. Впервые изучена эффективность включения прополиса и маточного молочка в комплекс терапии больных ХНЗЛ. Показано, что препараты продуктов пчеловодства повышают скорость восстановления функции внешнего дыхания и иммунного статуса больных по сравнению со стандартной терапией. Получен патент «Средство для ингаляции, обладающее бронхорасширяющим действием» с приоритетом от 15.09.2000 - №2174002.

Научно-практическая значимость

Выявленные биостимулирующие свойства прополиса и маточного молочка пчел позволяют утверждать, что они являются перспективной основой для создания препаратов, нормализующих неспецифическую резистентность организма. Обнаруженное иммуностимулирующее и радиозащитное свойство смеси предполагает возможность его использования в терапии различных заболеваний, связанных с ослаблением иммунитета и кроветворения. На основании полученных результатов обоснована перспектива разработки нового ингаляционного препарата, обладающего бронхорасширяющим действием.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Маточное молочко, прополис, и в большей степени их комплекс обладают модулирующим влиянием на пул мононуклеаров;
2. Смесь прополиса и маточного молочка обладают непосредственным бронхорасширяющим действием на изолированный препарат трахеи крыс;
3. Комплекс маточного молочка и прополиса обладает более выраженным радиопротекторным действием по сравнению с отдельными компонентами смеси;
4. Ингаляционная смесь продуктов пчеловодства (прополис и маточное молочко) при ее добавлении к стандартной терапии повышает эффективность лечения ХНЗЛ;
5. Сочетание маточного молочка и прополиса в определенном соотношении является перспективной основой для разработки ингаляционных препаратов, обладающих бронхорасширяющим действием.

Апробация работы

Основные положения доложены на VI, XI, XII международных научно-практической конференции по апитерапии (Рыбное, 1998, 2001, 2006), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 1999), научной конференции молодых ученых научно-исследовательских учреждений и высших медицинских учебных заведений Поволжья и Северного Кавказа (Нижний Новгород, 1999), на расширенном

заседании кафедры физиологии и биохимии человека и животных ННГУ (2010).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 2 из списка изданий, рекомендованных ВАК

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 141 странице машинописного текста, иллюстрированы 16 таблицами и 18 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 611 источников, из которых 475 на русском и 236 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были проведены на препаратах донорской крови человека и экспериментальных животных (крысы). Кроме того, изучались некоторые физиологические и биохимические показатели крови больных хроническими бронхо-легочными заболеваниями (ХНЗЛ) при включении в комплекс терапии ингаляцию смеси прополиса и маточного молочка пчел. Материалом для исследования служили образцы крови практически здоровых доноров (контрольная группа), больных с диагнозом бронхиальная астма (основная группа), поступивших на лечение в пульмонологическое отделение Дорожной больницы станции Горький-Московский.

Распределение материала по сериям исследований представлено в таблице 1.

В работе использовали: продукты пчеловодства - прополис (ГОСТ 28886-90, ВФС 42-1084-81), маточное молочко (ГОСТ 28888-90, ВФС 42-1291-83), и их водно-спиртовую суспензию, условно названную «Апингалин». Исследуемые продукты пчеловодства предоставлены опытной станцией пчеловодства «Краснополянское» РАСХН.

На первом этапе исследований эксперименты проводили на выделенных мононуклеарах человека. Были подобраны дозы физиологической и цитотоксической эффективности маточного молочка и прополиса, изучены их иммуностропные свойства.

На втором этапе исследований анализировали влияние препарата на изолированном органе – трахее крысы (Блаттнер с соавт., 1983). Изолированный препарат готовили в соответствии с правилами экспериментов на изолированных органах. Для этого у животных, обездвиженных цервикальной дислокацией позвончиков, извлекали

участок трахеи, помещали в камеру для перфузии (с раствором Тироде) и регистрировали его сократительную активность при действии смеси пчелопродуктов, прополиса, маточного молочка и ряда фармакологических агентов (в физиологических концентрациях: ацетилхолин - 5×10^{-8} г/мл, норадреналин - 2×10^{-6} г/мл, адреналин - 2×10^{-6} г/мл). Были определены показатели сократительной активности гладких мышц трахеи (в усл.единицах), с помощью регистрирующей системы.

Таблица 1

Серии исследований	Объект, материал исследований	Кол-во исследований
In vitro (донорская кровь)		
Цитотоксичность	эритроциты лейкоциты	40
Влияние препаратов на моноклеарную активность с помощью модели розеткообразования	лимфоциты	40
Комплементарная активность	система комплемента	80
Циркулирующие иммунные комплексы	ЦИК	80
Эффект адгезии		40
Эксперименты на животных		
Морфология и иммунология крови в норме и при облучении	крысы	30
Сократительная активность изолированных препаратов трахеи	крысы	40
Пациенты с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ)		
Спирометрия, иммунологические показатели крови, гомеостатические показатели крови		40

Следующий этап экспериментов был проведен в условиях моделирования альтерации функций (лучевая болезнь) у крыс. Животные подвергались однократной ингаляции препаратом в проточной камере ежедневно по 10 мин курсом 14 дней. После окончания курса терапии у животных опытной и контрольной (без лечения) определяли количество в крови эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина. Облучение животных проводили на базе отделения лучевой терапии городского онкологического центра с применением терапевтической установки «Агат-С» (^{60}Co). Животных (30 крыс) делили на две группы. Первой группе животных, которая состояла из 20 крыс, искусственно создавали лучевую болезнь средней степени тяжести, путем однократного облучения γ - лучами на терапевтической установке «Агат-С», дозой 3 Гр. Затем каждая группа делилась на 2 подгруппы: контрольную и опытную. Контрольным животным

вводили физиологический раствор. Третья группа из 10 животных облучению не подвергались, а служила для изучения влияния исследуемой композиции на систему крови здоровых животных. Взятие крови у крыс производилось из подязычной вены на 7, 14, 21 и 28 сутки после облучения у первой и второй групп и на 1, 8, 15 сутки после окончания введения препарата у животных третьей группы.

В отдельной серии исследований, на базе пульмонологического отделения Дорожной больницы станции Горький-Московский, изучались показатели крови и спирометрии 44 пациентов с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) – хронический бронхит, бронхиальная астма - в возрасте от 20 до 40 лет (лечащий врач Е.В.Плоткин). Больные были разделены на 2 равные группы: контрольную и основную. В контроле проводилась базовая общепринятая терапия: бронходилататоры, глюкокортикоиды, препараты сурфактанта. В основной группе дополнительно проводили ингаляцию суспензии прополиса (ВФС 42-1084-81) и маточного молочка (ВФС 42-1291-83), по 2 мл, в течение 10 мин, при следующем соотношении компонентов: прополис-1 масс.%, маточное молочко-2 масс.%, спирт-4 масс.%, вода - остальное. Ингаляции повторяли ежедневно, в течение 10 дней, при помощи ультразвукового ингалятора ИУП-01М и САРТОМАС-ULTRA.

В работе был применен комплекс лабораторных методов:

Цитотоксичность (по методу Меньшикова, 1987); Реакция розеткообразования (по методу Ляпона, 1980, в модификации Колосовой и др., 1985; Маянского, 1989); Комплементарная активность по методу Мотавкиной (1980) на стандартной системе комплемента сыворотки морской свинки (НПО “Иммунопрепарат”) по гемолизу геля в агарозе; Метод изучения адгезивных свойств иммунокомпетентных клеток (Маянский, 1989); Уровень циркулирующих иммунокомплексов (ЦИК) определяли при помощи реакции преципитации ПЭГ 6000 (Тишнер, 1987).

Определение гемоглобина крови гемоглобинцианидным методом; Определение количества эритроцитов фотометрическим методом; Об активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению молекулярных продуктов липопероксидации – диеновых конъюгатов. (Каган и др., 1986; Биленко, 1989).

Исследования физиологических и клинических показателей крови больных:

спирометрия и анализы крови на количество эритроцитов, содержание гемоглобина, ретикулоцитов, лейкоцитов (по методу Панченкова), нейтрофилов, а также на концентрацию циркулирующих иммунокомплексов (ЦИК) проводили с применением общепринятых методов исследования в клинической лабораторной диагностике (Меньшиков, 1987); Количество лимфоцитов определялось методом

непрямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции на клетках, прикрепленных к стеклу поли-L-лизином. В реакции использовались моноклональные антитела (МКА) серии ИКО. Количество лимфоцитов определялось в относительных и абсолютных значениях, с вычислением иммунорегуляторного индекса (ИРИ) - соотношение: Т-хелперы/Т-супрессоры; *Определение содержания иммуноглобулинов* в сыворотке крови пациентов осуществляли по методу простой радиальной иммунодиффузии по методу Манчини (Mancini, 1963) в модификации, изложенной в монографии Mayer и Walker (Меньшиков, 1987).

Иммунологические показатели крови больных определяли на базе клинико-диагностической лаборатории Нижегородского областного диагностического центра.

Исследуемые показатели гомеостаза пациентов обеих групп определялись в период поступления в стационар, и после окончания курса терапии.

Результаты исследований обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, при $p < 0,05$. Обработку данных осуществляли на персональном компьютере с помощью пакетов прикладных программ STADIA и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние продуктов пчеловодства и их комбинации на иммунологические показатели крови *in vitro*

В серии исследований на выделенных лейкоцитах человека были подобраны дозы физиологической и цитотоксической эффективности маточного молочка и прополиса.

В ходе эксперимента было установлено, что маточное молочко обладает дозозависимым эффектом. Установлено, что концентрации от 62,5 до 500 мкг/мл являются оптимальными физиологическими, а концентрация 750 мкг/мл – пограничной (табл.2). При концентрации выше 1000 мкг/мл показан выраженный цитотоксический эффект.

Далее работа проводилась с оптимальными физиологическими концентрациями. Они составили: для маточного молочка – 500 мкг/мл, а для прополиса – 2,5% раствор (19,68 мкг/мл).

Первым из серии иммунологических исследований нами были определены *розеткообразующие свойства Т-лимфоцитов крови* в зависимости, от концентрации, начиная от физиологической, до более низкой (табл.3).

Таблица 2

Влияние различных концентраций маточного молочка на жизнеспособность иммунокомпетентных клеток крови человека (n=40).

№	C (мкг/мл)	% живых клеток, M±m	P
1	62,6	97,40±0,43	< 0,05
2	125	96,90±0,31	< 0,01
3	250	96,50±0,37	< 0,001
4	500	96,00±0,37	< 0,001
5	750	88,40±0,34	< 0,001
6	1000	85,00±0,26	< 0,001
	Контроль	98,60±0,27	

Примечание: P – достоверность различий по отношению к контролю.

Таблица 3

Влияние препарата на розеткообразующие свойства T-лимфоцитов крови (n=40)

№	C, мкг/мл	E-РОК, M±m, %	
		"активные"	"общие"
1	62,5	17,07±0,91	27,86±0,94
2	125	20,43±0,84*	31,07±0,91**
3	250	11,07±0,99*	17,64±0,74**
4	500	7,14±0,94**	10,14±0,94**
5	контроль	15,50±1,01	25,79±0,69

Примечание: В табл. 3-5 показана существенность различий (*-p≤0,01; **-p≤0,001) по сравнению с контролем.

Было установлено, что при понижении концентрации маточного молочка с 500 мкг/мл до 62,5 мкг/мл количество «активных» и «общих» розеток увеличивалось в 2,5 раза.

При дальнейшем уменьшении концентрации эффект розеткообразования выявлен не был.

В следующей серии опытов изучено влияние препаратов на **активность системы комплемента** сыворотки крови. Отмечено выраженное повышение активности системы комплемента, под действием маточного молочка - на 38% при физиологической (пограничной) концентрации, равной 500 мкг/мл. Установлено, что при постепенном уменьшении концентрации исследуемого раствора комплементарная активность сыворотки крови понижалась. А именно, при концентрации 250 мкг/мл она составила $128,42 \pm 4,00\%$, при концентрации – 125 мкг/мл – $118,94 \pm 3,15\%$, а при концентрации 62,5 мкг/мл только $102,10 \pm 3,15\%$. В контрольной группе комплементарная активность составляла $100 \pm 3,15\%$. Под действием прополиса (11,1% раствор – 92,5 мкг/мл) нами было выявлено незначительное снижение комплементарной активности. Оно составило – 15%.

С целью выяснения механизмов изменения розеткообразующей способности лимфоцитов, нами были изучены **адгезивные свойства** иммунокомпетентных клеток. Отмечено, что при концентрациях препарата 250 и 500 мкг/мл адгезивные свойства достоверно не изменяются по сравнению с контролем. Как видно из таблицы 4 только при концентрации 125 мкг/мл установлен статистически достоверный стимулирующий эффект маточного молочка на адгезию иммунокомпетентных клеток крови.

Таблица 4

Влияние маточного молочка на адгезию иммунокомпетентных клеток крови (n=40).

№	С (мкг/мл)	% прилипания (M±m, %)
1	62,5	$33,50 \pm 1,27^*$
2	125	$38,30 \pm 1,49^{**}$
3	250	$32,30 \pm 1,89$
4	500	$30,10 \pm 1,45$
5	контроль	$31,30 \pm 1,63$

При сравнительном анализе изменения адгезии, как одного из показателей рецепторной функции клеток крови, под влиянием исследованных нами БАВ в большинстве случаев выявлен параллелизм между изменениями РО-активности и адгезивных свойств лимфоцитов. Мы полагаем, что изменение розеткообразующей активности связано с возможной активацией субпопуляции лимфоцитов, которые в неактивном состоянии не обладают способностью связывать эритроциты барана.

Следующим этапом работы было изучение действия препарата на **уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)** сыворотки крови.

В ходе проведения исследования выявлено статистически достоверное повышение уровня ЦИК в сыворотке наиболее выраженное при концентрации 400 мкг/мл (табл. 5).

Таблица 5

Воздействие маточного молочка на уровень циркулирующих иммунных комплексов сыворотки крови (n=80, оптическая плотность).

№	Концентрация С (мкг/мл)	Оптическая плотность, ед/мл, M+m
1	250	82,43±1,09**
2	400	97,29±1,29**
3	1000	80,86±1,01*
4	контроль	74,57±0,97

Действие исследуемых веществ на изолированную трахею крыс.

В опытах было установлено, что действие смеси маточного молочка и прополиса на препарат трахеи крысы носит двухфазный характер: первая фаза – кратковременного сокращения, вторая – фаза расслабления, продолжавшаяся в зависимости от дозы 2 – 2,5 минуты. Как видно из таблицы 6, раствор прополиса также вызывал двухфазную реакцию, которая отличалась от действия Апингалина тем, что фаза сокращения препарата трахеи по длительности и интенсивности была равна фазе расслабления. В отличие от прополиса, маточное молочко вызывало только расслабление гладких мышц трахеи.

Таким образом, из опытов следует, что в комбинированном препарате на основе прополиса и маточного молочка за фазу сокращения в большей степени отвечает прополис, а за расслабление трахеи – маточное молочко. При этом совместное их влияние приводит к более выраженной фазе расслабления препарата трахеи – бронхорасширяющему эффекту.

Из табл.6 следует, что при введении 1 мл смеси №1 в термостатируемую камеру эффект расслабления препарата трахеи (увеличение длины) наступал через 1 мин., длился около 1,5 часа. Увеличение длины препарата при этом составляло 7 усл.ед.. Эффект расслабления не устранялся дозой ацетилхолина. Препарат изолированной трахеи восстанавливал первоначальную длину и тест-реакцию на ацетилхолин (10^{-7} г/мл) после трехкратного отмывания питательным раствором. При введении в перфузионную камеру смеси №2 эффект наблюдался через 1 мин. в течение 10 мин. на 1 условную единицу. Увеличение длины препарата трахеи устранялось введением в кювету ацетилхолина в дозе $3 \cdot 10^{-8}$ г/мл. При этом препарат изолированной трахеи восстанавливал первоначальную длину и реакцию на тест-контроль на ацетилхолин в дозе 10^{-8} г/мл, после трехкратного отмывания питательным

раствором. И наконец, при введении в термостатируемую камеру 1 мл. смеси №3 эффект наступил через 30 сек и длился более 2,5 часов. При этом увеличение длины препарата составило 9 усл.ед. однако эффект расслабления не устранялся ацетилхолином (препарат изолированной трахеи не восстанавливал первоначальную длину в тест-реакции на ацетилхолин после многократного отмывания).

Таблица 6

Изменение реакции (в усл.ед.) сокращения-расслабления препарата изолированной трахеи крыс после добавления в омывающий раствор различных веществ

Средство/вещество	Фаза сокращения	Фаза расслабления	Тест-реакция на ацетилхолин (сокращение)
Раствор Тироде	отсутствует	отсутствует	5
Прополис	4	4	3
Маточное молочко	отсутствует	3	1
Смесь: маточное молочко-прополис-спирт-вода (масс.%)			
<u>Смесь №1:</u> мат.молочко-2 прополис-1 спирт-4, вода-93	0,5	7	отсутствует
<u>Смесь №2:</u> мат.молочко- 0,5 прополис-0,2 спирт-0,8, вода-98,5		1	1
<u>Смесь №3:</u> мат.молочко-5 прополис-5 спирт-25, вода-65		9	отсутствует

Таким образом в ходе эксперимента было установлено, что наиболее оптимальной смесью, воздействующей на изолированный препарат трахеи крысы является смесь №1, которая состоит из: 2 масс.% маточного молочка, 1 масс.% прополиса, 4 масс.% спирта, и 93 масс.% воды.

На основании результатов, полученных в опытах *in vitro* и изолированных препаратах трахеи крыс, выявлено, что маточное молочко, прополис, а также их определенная водно-спиртовая смесь приводят как к стимуляции иммунных реакций клеток крови, так и вызывает непосредственное расслабляющее действие на гладкую мускулатуру трахеи животных.

Влияние продуктов пчеловодства и Апингалина на морфологические и иммунологические показатели крови крыс при γ -облучении

Результаты исследований показали, что исследуемые продукты пчеловодства в разной степени обладают защитными свойствами на систему красной крови крыс. В опытной группе животных общее количество эритроцитов и гемоглобина восстанавливалось быстрее, чем в контрольной группе. При этом эффект был более выражен в группе, где животные получали ингаляцию смеси прополиса и маточного молочка (рис.1).

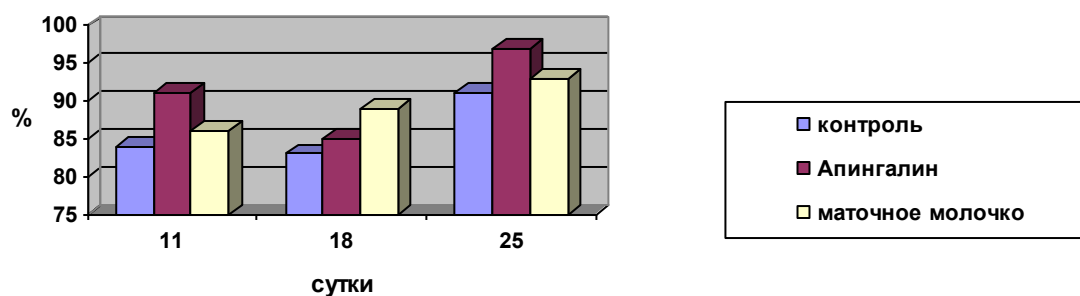


Рис.1. Динамика изменения количества эритроцитов в крови облученных животных (3 Гр) при терапевтическом применении продуктов пчеловодства.

Восстановление системы белой крови в группах леченых животных также шло более активно, чем в контрольной. Применение маточного молочка с прополисом в виде ингаляционной смеси способствовало восстановлению общего количества лейкоцитов. При лечении лучевой болезни средней степени тяжести исследуемая смесь достоверно повышала количество лейкоцитов (на 12,9 – 27,2%) на протяжении всего периода наблюдений (табл.7).

Различные формы лейкоцитов обладают разной радиорезистентностью (Белоусова и др., 1978; Umansky, 1982). Для лучевой болезни характерна очень сильно выраженная лимфопения, так как лимфоциты, несмотря на то, что они являются зрелыми элементами, очень чувствительны к воздействию ионизирующего излучения и гибнут в первые же часы после облучения (Жербин, Чухловин, 1980; Хансон, Комар, 1985). Иммунологическая реактивность организма поддерживается за счет более резистентных гранулоцитов, уровень которых повышается в силу созревания неповрежденных клеток в костном мозге и выхода из тканевых депо

(Груздев, 1979; Denescamp, Rojas, 1989). Наши экспериментальные данные подтверждают литературные (Николаева, 2000): во всех опытных группах количество лимфоцитов было выше контрольных значений на протяжении всего эксперимента (на 0,2 – 20,6%), также как и общее количество нейтрофилов (на 14,3%), причем терапевтический эффект был более выражен в группе с ингаляцией. Следует отметить, что основную массу нейтрофилов в этой группе составляли молодые палочкоядерные формы, что свидетельствует об эффективной защите кроветворения от разрушительного действия радиации.

Таблица 7

Изменение общего количества лейкоцитов в крови облученных (3 Гр) животных при терапевтическом применении пчелопродуктов.

группа	показатель	Интактные животные	Сутки после облучения		
			11	18	25
		M±m	M±m	M±m	M±m
Контроль (нелеченые животные)	Общее кол-во лейкоцитов	11,0±0,42	1,9±0,16	3,9±0,12	6,4±0,47
Маточное молочко	Общее кол-во лейкоцитов	11,0±0,42	4,3±0,33*	4,3±0,33	6,1±0,19
Смесь маточного молочка и прополиса	Общее кол-во лейкоцитов	11,0±0,42	3,0±0,09*	6,6±0,17*	9,3±0,33*

Примечание: различие показателей до и после лечения, а также между контрольной и исследуемой группой больных после лечения во всех случаях достоверно ($p \leq 0,05$).

Анализируя выявленное радиопротекторное действие продуктов пчеловодства на систему крови, следует отметить, что одним из механизмов этого действия может быть их влияние на перекисное окисление липидов, повышение активности которого – один из основных поражающих факторов при лучевом поражении (Бурлаков и др., 1975; Рысилькова, 1987; Коломийцева, 1989; Поливода и др., 1990). В наших экспериментах также было установлено, что активность свободнорадикальных процессов во всех группах возрастала в первые сутки после окончания лечения, что выражалось в увеличении количества диеновых конъюгатов (рис. 2). Применение продуктов пчеловодства в терапии лучевой болезни у крыс приводило к изменению активности окислительных процессов. Так, если на 11 сутки после облучения дозой 3 Гр ингаляция прополиса и маточного молочка приводила к увеличению концентрации диеновых конъюгатов в крови на 55,7%, по сравнению с нелечеными животными, то уже к 18 суткам

концентрация первичных продуктов была на 32,3% меньше, чем в контроле и к концу эксперимента снижалась до значений у интактных животных.

Полученные результаты свидетельствуют об индуцируемом прополисом и маточным молочком снижении активности процессов перекисного окисления липидов. Начальная активация перекисидации может быть связана как с прямым действием продуктов пчеловодства на мембраны (связанном с наличием в составе маточного молочка ненасыщенных жирных кислот), так и с усилением пролиферации клеток в кроветворных органах, что сопровождается усилением активности ПОЛ. Тот факт, что к концу эксперимента содержание первичных продуктов в опытных группах снижается постепенно, свидетельствует, по нашему мнению, в пользу предположения о постепенной активации антиоксидантных механизмов.

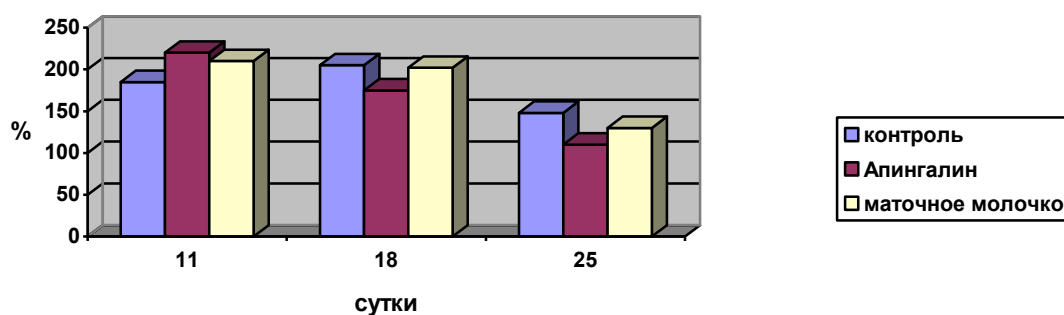


Рис.2. Динамика изменения концентрации диеновых конъюгатов в плазме облученных животных (3 Гр) при терапевтическом применении продуктов пчеловодства.

На основании полученных результатов можно заключить, что прополис и маточное молочко, а в большей степени – их сочетание, являются эффективными терапевтическими средствами при действии γ -облучения, облегчает течение лучевой болезни, в разной степени влияя как на красную, так и на белую кровь. Мы полагаем, что такая активность обеспечивается компонентами изученных продуктов пчеловодства. Известно, что в составе прополиса достаточно широко представлены флавоны и флавонолы, основными компонентами которых являются лютеолин, апигенин, кверцетин, кемпферол и другие биофлавоноиды (Поправко, 1978). Антиоксидантные свойства биофлавоноидов и препаратов на их основе широко известны (Ratty, Das, 1988; Тюкавкина и др., 1996). В состав маточного молочка входит большое количество серусодержащих аминокислот и белков с большим количеством SH-групп, которые также обладают антиоксидантным действием (Ehcido et al., 1986; Крылов, Сокольский, 2000).

Иммунологические и спирометрические показатели у больных ХНЗЛ при применении в комплексе лечения продуктов пчеловодства и их смеси

Следующим этапом исследований было изучение показателей крови и спирометрии у больных с различными формами ХНЗЛ. Результаты проведенных исследований показали, что введение в комплекс основных методов лечения больных ХНЗЛ апитерапии смесью прополиса и маточного молочка позволило существенно повысить эффективность лечения. Это проявлялось в улучшении клинической картины течения ХНЗЛ. В период лечения у больных исследуемой группы уже через 2-3 дня после начала лечения заметно уменьшался кашель, одышка, боли в грудной клетке, восстанавливался сон, нормализовывалась температура. В отличие от этого у больных контрольной группы (не получавших продукты пчеловодства) те же самые улучшения наступали через 5-6 дней. Количество койко-дней у больных опытной группы было, в среднем на 3-4 дня меньше относительно количества койко-дней больных контрольной группы.

При анализе полученных результатов установлено, что у больных существенно повышаются характеристики внешнего дыхания, характеризующие проходимость крупных и средних бронхов.

На основании проведенного обследования больных с бронхо-легочными заболеваниями было подтверждено, что преобладающей в клинике таких заболеваний является обструктивная легочная недостаточность. О наличии обструктивного синдрома свидетельствует полученное при спирометрии значительное снижение ФЖЕЛ-($54,17 \pm 1,00$ от 100% нормы), ОФВ₁- ($49,08 \pm 3,52$ соответственно), ПОС и МОС₂₅₋₇₅ с уменьшенным (значительно меньше 1) индекса Тифно (табл.8).

Лечение с применением препаратов, по общепринятой схеме лечения в контрольной группе давало некоторый положительный эффект (увеличение ФЖЕЛ до $73,08 \pm 3,2$, ОФВ₁- до $68,67 \pm 2,8$), ПОС- до $66,18 \pm 4,14$, но полностью не снимало обструктивный синдром (индекс Тифно – значительно меньше 1, ОФВ₁- ниже нормы).

Включение в комплекс терапии бронхолегочных заболеваний ингаляции смеси маточного молочка и прополиса приводит к более выраженной нормализации вентиляции легких, повышая ФЖЕЛ, ОФВ₁, ПОС (табл.8).

О снятии обструктивного синдрома, свидетельствовала также нормализация ЖЕЛ и индекса Тифно, и повышение показателей проходимости крупных бронхов (МОС₂₅), средних бронхов (МОС₅₀), мелких бронхов (МОС₇₅).

Таблица 8

Изменение спирометрических показателей у больных с ХНЗЛ при применении курсовой ингаляции смеси прополиса и маточного молочка.

Спирометрические показатели, % к должной величине (100%)	Лечение общепринятыми методами		Лечение с использованием смеси прополиса и маточного молочка	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
МОС ₂₅	36,50±3,40	60,17±4,85	34,38±3,56	72,92±1,92
МОС ₅₀	37,58±3,50	60,08±3,95	33,50±2,28	72,83±1,86
МОС ₇₅	40,17±3,26	60,54±2,97	38,75±2,29	70,58±1,86
ОФВ ₁	49,08±3,52	68,67±2,89	51,33±1,73	82,00±1,49
ФЖЕЛ	55,08±3,23	73,08±3,20	54,64±1,99	87,50±0,48
ПОС	41,50±3,72	66,18±4,14	41,08±2,52	75,90±0,87
ЖЕЛ	69,17±1,84	76,83±1,47	68,47±1,85	87,67±0,69
ОФВ ₁ /ЖЕЛ	71,10±1,53	89,5±2,54	74,20±3,42	93,65±0,57

Примечание: различие показателей до и после лечения, а также между контрольной и исследуемой группой больных после лечения во всех случаях достоверно ($p < 0,05$).

Полученные результаты позволяют заключить, что включение в комплекс стандартной терапии больных ХНЗЛ ингаляции смеси прополиса и маточного молочка повышает эффективность лечения. Мы полагаем, что этот эффект вызывается как непосредственным влиянием смеси на эпителиальную ткань и мускулатуру бронхов с соответствующим их расширением, улучшением структуры сурфактанта, уменьшением вязкости мокроты, местным противовоспалительным эффектом, так и ее опосредованным эффектом, связанным с резорбтивным действием компонентов пчелопродуктов.

Доказательством того, что комбинация маточного молочка и прополиса при их ингаляции оказывала не только непосредственное, но и резорбтивное действие, являются наши данные, полученные при изучении иммунологических показателей крови больных.

Известно, что ведущая роль в патогенезе хронических неспецифических заболеваний легких (ХНЗЛ) отводится иммунным механизмам. При этом, в условиях снижения иммунологической реактивности организма, уменьшается эффективность антибактериальной терапии, часто усугубляющей иммунологические нарушения. В наших исследованиях было установлено, что вместе с нормализующим действием смеси на качественный состав крови у больных происходила более быстрая по сравнению с контрольной группой нормализация показателей иммунной системы. Прежде всего, это было продемонстрировано при измерении уровня иммуноглобулинов. Было показано, что если этот уровень до начала лечения

был сниженным, то после окончания курса лечения он повышался и приближался к верхним границам среднестатистической нормы (табл.9).

Таблица 9

Уровень иммуноглобулинов (г/л) в крови больных с хроническими заболеваниями легких при включении в комплекс терапии ингаляции смеси.

Статистич. показатель	ИММУНОГЛОБУЛИНЫ					
	Ig M		Ig A		Ig G	
	до	после	до	после	до	после
	лечения		лечения		лечения	
M ± m	0,71±0,09	1,30±0,09	0,84±0,10	2,32±0,22	10,07±0,50	12,09±0,60

Примечание: различия в содержании иммуноглобулинов до и после лечения во всех случаях достоверны ($p < 0,05$).

На основании полученных результатов можно заключить, что смесь при ингаляции больным ХНЗЛ оказывает выраженное иммуностимулирующее действие. Это вполне согласуется с данными литературы об иммуностимулирующем действии, как веществ прополиса, так и маточного молочка. В частности, показано, что под влиянием прополиса повышается уровень пропердина, усиливается фагоцитоз и стимуляция выработки агглютининов (Кивалкина, 1964). Как следует из обзора литературы, маточное молочко также повышает специфическую иммунную толерантность (Сокольский, 1996).

Как следствие иммуномодулирующего действия смеси продуктов пчеловодства при лечении больных ХНЗЛ в наших условиях было существенное снижение у них уровня циркулирующих иммунокомплексов. При анализе уровня ЦИК в крови больных контрольной группы было показано, что при заболеваниях дыхательной системы увеличивается содержание в крови циркулирующих иммунных комплексов, что является характеристикой интенсивно идущего воспалительного процесса (Копьева, Макарова, Хоменко, 1986). В наших исследованиях было установлено, что перед началом лечения у больных этот показатель был резко повышен ($53,00 \pm 5,81$ ед/мл). При использовании в комплексе лечения композиции после окончания курса было получено достоверное снижение ЦИК в крови ($28,00 \pm 2,55$ ед/мл).

Из полученных результатов следует, что иммуностимулирующее действие препарата способствовало более быстрому снятию воспалительного процесса, что приводило к уменьшению в крови содержания ЦИК. Другим доказательством тенденции к выздоровлению можно считать относительное

большее по сравнению с другими иммуноглобулинами нарастание в крови иммуноглобулинов IgA, т.к. считается, что именно этот класс глобулинов завершает иммунную реакцию течения воспалительного процесса, регулируя его на уровне местного иммунитета (Пол с соавт., 1987).

На основании проведенных исследований следует заключить, что исследуемая констелляция пчелопродуктов – прополиса и маточного молочка при их ингаляции обладает выраженным иммуностимулирующим эффектом. Можно предположить, что на иммунную систему оказывается воздействие как со стороны веществ составляющих прополиса, так и со стороны маточного молочка.

Исходя из полученных данных следует, что курсовое применение смеси маточного молочка и прополиса в сочетании с общепринятой терапией позволило повысить эффективность лечения больных ХНЗЛ по сравнению с терапией общепринятыми средствами. Это проявилось как в улучшении спирометрических показателей, так и иммунологических показателей, позволивших уменьшить клинические признаки заболевания и сократить сроки лечения. Анализ исследованных показателей гомеостаза позволил заключить, что смесь продуктов пчеловодства оказывала не только местное действие на слизистую бронхолегочного ствола, но и общее действие на организм, сопровождающееся нормализацией функциональных показателей спирометрии и повышением иммунного статуса организма.

Таким образом, на основании проведенных исследований и полученных результатов следует заключить, что сочетание пчелиного маточного молочка и прополиса в форме суспензии для ингаляций вызывает повышение резистентности организма человека и животных, оказывая гемо- и иммуностимулирующее действие, а также бронхорасширяющий эффект при альтерации функций. Комплекс маточного молочка и прополиса обладает более выраженным радиопротекторным действием по сравнению с отдельными продуктами пчеловодства в условиях моделирования лучевой болезни у крыс и повышает скорость восстановления функции внешнего дыхания и иммунного статуса больных ХНЗЛ по сравнению со стандартной терапией. Выявленные биостимулирующие свойства комплекса прополиса и маточного молочка пчел являются перспективной основой для разработки препаратов, нормализующих неспецифическую резистентность организма.

ВЫВОДЫ

1. В опытах *in vitro* установлено, что маточное молочко, прополис, и в большей степени их смесь «Апингалин» обладают иммуномодулирующим влиянием на пул мононуклеаров, что выражается в увеличении количества розеткообразующих клеток, стимулирующем адгезивном эффекте, а также повышении уровня ЦИК;
2. Обработка раствором «Апингалина» изолированного препарата трахеи крыс приводит к выраженной реакции расслабления гладкой мускулатуры ее стенки. Выявленная реакция существенно ослаблялась при отдельном применении прополиса или маточного молочка, свидетельствуя о потенцировании бронхорасширяющего эффекта «Апингалина».
3. На модели лучевой болезни средней тяжести у крыс показано, что курсовая ингаляция «Апингалина» оказывает радиозащитное действие, повышая антиоксидантную активность - снижая повышенный уровень МДА, нормализуя сниженный гематопоз. Это действие было более выраженным по сравнению с радиопротекторным действием отдельных компонентов «Апингалина».
4. Применение ингаляционной смеси маточного молочка и прополиса в комплексе со стандартной терапией больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких позволило повысить эффективность терапии по сравнению с терапией больных общепринятыми методами, что приводило к уменьшению тяжести течения болезни и сокращению сроков выздоровления.
5. Курсовая ингаляция прополиса и маточного молочка по показателям ЖЕЛ, ФЖЕЛ, МОС, ПОС, ОФВ₁, индекса Тифно, улучшает спирометрические характеристики легких, что свидетельствует о повышении воздухопроницаемости крупных и средних бронхов и связано с соответствующим уменьшением обструктивного синдрома.
6. Подобранный состав ингредиентов маточного молочка и прополиса нормализует морфофункциональные характеристики крови (гемоглобин, СОЭ, лейкоциты) и повышает ее иммунологические показатели, увеличивая уровень иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG, и уменьшая количество циркулирующих иммунокомплексов, что может лежать в основе механизмов терапевтического действия препарата при респираторных заболеваниях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Крылов В.Н., Сокольский С.С., **Улитин И.Б.** Комбинированный препарат с маточным молочком и витамином С // Апитерапия сегодня: Матер. 4 научно-практ. конф. по апитерапии. Рыбное. 1995. С. 121-122.
2. Добротина Н.А., Крылов В.Н., **Улитин И.Б.** – Иммунологические свойства малых доз пчелиного яда // Рукопись депонирована в Государственной центральной медицинской библиотеке 03.04.97. № Д-25540
3. **Улитин И.Б.** Иммунологические аспекты терапии бронхолегочной патологии человека препаратами продуктов пчеловодства // Матер. Конф. молодых ученых России с международн. участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». М.: Изд-во ММА им. И.М.Сеченова, 1998. - С. 128-129.
4. Корягин А.С., **Улитин И.Б.**, Сандова О.М., Новиков В.В., Крылов В.Н. Ингаляция продуктов пчеловодства в экспериментальной терапии лучевой болезни // Матер. 6 научно-практ. конф. по апитерапии «Апитерапия сегодня». Рязань: Изд-во госмедуниверситета им. И.П.Павлова, 1998.- С.82-83.
5. Смирнов А.М., Плоткин Е.В., **Улитин И.Б.**, Крылов В.Н. Апилак и Апингалин в лечении больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких //Матер. 6 научно-практ. конф. по апитерапии «Апитерапия сегодня». Рязань: Изд-во госмедуниверситета им. И.П.Павлова, 1998. - С. 161-163.
6. Александрова М.А., Величанская А.Г., **Улитин И.Б.** Исследование свойств гиалуронидазы как фактора вторжения-распространения чужеродного агента в организме // Структура и регуляция биосистем: Сборник работ молодых ученых биол. фак-та ННГУ. Н.Новгород: Изд-во ННГУ. 1999. С.123-126.
7. Крылов В.Н., Корягин А.С., Ошевенский Л.В., **Улитин И.Б.** Разработка методов и средств профилактики и лечения заболеваний ведущих профессий железнодорожников // Важнейшие научные результаты: Сб.кратких описаний. Н.Новгород, 1999. Изд-во ННГУ. С. 123-126.
8. Пономаренко (Николаева) А.А., **Улитин И.Б.** Влияние пчелиного яда на систему крови при экспериментальной лучевой болезни. Структура и регуляция биосистем. // Сб. работ молодых ученых ННГУ, Н.Новгород, 1999. Изд-во ННГУ. С.149-152.
9. Крылов В.Н., Ошевенский Л.В., **Улитин И.Б.**, Горелая С.В. и др. Средство для ингаляций, обладающее бронхорасширяющим действием. Патент Российской Федерации № 2174002 на изобретение. Приоритетная справка №2000123749 от 15.09.2000.
10. Копылова С.В., Сокольский С.С., **Улитин И.Б.**, Крылов В.Н. Апингалин в комплексной терапии больных ИБС // Апитерапия сегодня (сб. № 11)\

Матер.ХІ Всеросс. Н-практ.конф. Рыбное, Изд-во НИИ пчеловодства РАСХН, 2004. С. 66-69.

11. Улитин И.Б., Крылова Е.В., Сокольский С.С. Исследование иммуностропных свойств маточного молочка пчел в опытах *in vitro* // Апитерапия сегодня (сб. №12)\ Материалы Всероссийской Научно-практ.конф. Рыбное, Изд-во НИИ пчеловодства РАСХН, 2006. С. 70-75.

12. Улитин И.Б., Копылова С.В., Плоткин Е.В., Крылов В.Н. Механизмы повышения резистентности организма при ингаляционной апитерапии бронхолегочных заболеваний // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. Изд-во ННГУ. № 2, 2008. С. 77-81.

Список сокращений

БАВ – биологически активные вещества

ХНЗЛ – хронические неспецифические заболевания легких

РОК – розеткообразующие клетки

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СГЭ – содержание гемоглобина в одном эритроците

ДК – диеновые коньюгаты

ФЖЕЛ – форсированная (функциональная) емкость легких

ЖЕЛ – жизненная емкость легких

ОФВ – объем форсированного выдоха за 1 секунду

ПОС – пиковая объемная скорость

МОС – максимальная объемная скорость