

УДК 616-092.9(599.323.4+616.24-005.98):638.15(615.322:582)

ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ МАТОЧНОГО МОЛОЧКА ПЧЕЛ И ПРОПОЛИСА ПРИ ОТЕКЕ ЛЕГКИХ У КРЫС**В.Н.Крылов¹, С.В.Копылова¹, Ю.А.Старателева¹, В.П.Смирнов²**¹*Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского**Министерства образования и науки РФ, 603950, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23*²*Нижегородская государственная медицинская академия**Министерства здравоохранения РФ, 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1***РЕЗЮМЕ**

Целью исследования явилось изучение механизмов действия смеси для ингаляций на основе маточного молочка пчел и прополиса (апингалин) при экспериментальном отеке легких. Исследования проводились на половозрелых крысах (самцах) массой 0,18-0,2 кг, которые были разделены на группы: интактные животные; контроль – животные, которым воспроизводили адrenaловый отек легких; опыт – животные, которым воспроизводили отек, а затем производилась курсовая ингаляция апингалина. Органы для морфологического и биохимического анализа забирались через сутки после прекращения эксперимента. На препаратах изолированной трахеи крыс исследована реакция сокращения-расслабления после добавления препарата апингалин. При изучении терапевтического действия данной смеси измеряли весовой коэффициент и сухой остаток, проводили гистологическое исследование легочной ткани. Активность процесса перекисного окисления липидов оценивали по содержанию в гомогенате легких диеновых, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа; окисленную модификацию белков – по уровню карбонильных производных. Установлено, что действие препарата на основе маточного молочка пчел и прополиса на изолированный препарат трахеи имеет двухфазный характер: первая – кратковременная фаза сокращения препарата, а вторая – длительная – его расслабления, опосредованного через активацию бета-адренорецепторов. Курсовая 10-дневная ингаляция препарата апингалин снижала количество окисленных форм белка и препятствовала окислению липидов в ткани легкого крыс.

Ключевые слова: маточное молочко пчел, прополис, отек легких, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белка.

SUMMARY**EFFECT OF THE COMPLEX MEDICATION MADE OF BEE ROYAL JELLY AND PROPOLIS AT PULMONARY EDEMA OF RATS****V.N.Krylov¹, S.V.Kopylova¹, J.A.Starateleva¹, V.P.Smirnov²**¹*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Gagarin Ave., 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation*²*Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin Sq., Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation*

The purpose of this study was to investigate the mechanisms of effect of inhaled mixture made on the basis of bee royal jelly and propolis (apingalin) in experimental pulmonary edema. Studies were conducted on adult rats (male) with the weight of 0.18-0.2 kg; the rats were divided into groups: intact animals, control animals with adrenal experimental pulmonary edema, experience animals with pulmonary edema; all of them then inhaled apingalin. The bodies for morphological and biochemical analyses were collected one day after the termination of the experiment. In preparations of isolated trachea of rats, the reaction of constriction-relaxation after adding apingalin was studied. When studying the therapeutic effect of the mixture, the weight ratio and dry residue were measured; the histological examination of lung tissue was done. The activity of the process of lipid peroxidation was assessed by the content of diene, triene conjugates and Schiff bases in lung homogenates; oxidized protein modification was estimated in terms of carbonyl derivatives. It was found that the effect of the drug on the basis of royal jelly and bee propolis on isolated tracheal preparation is biphasic: the first one is a short-term phase of constriction of the preparation, and the second one is a long-term phase of its relaxation mediated through the activation of beta-adrenergic receptors. Course of 10-day inhalation of apingalin reduces the amount of oxidized forms of the protein and prevents the oxidation of lipids in the lung tissue of rats.

Key words: bee royal jelly, propolis, pulmonary edema, lipid peroxidation, oxidative modification of proteins.

Актуальной и социально значимой проблемой современной медицины является поиск новых подходов к повышению эффективности и снижению токсичности лекарственных средств, традиционно применяемых для профилактики и лечения различных заболеваний. Одним из путей решения этой проблемы является применение биогенных средств, в первую очередь – использование продуктов жизнедеятельности медоносных пчел [2].

На кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского разработано средство, обладающее бронхорасширяющим действием на основе маточного молочка пчел и прополиса для ингаляционного введения (патент РФ № 2174002).

Маточное молочко, прополис – уникальные продукты природы, содержащие в сбалансированном сочетании ряд важнейших биологически активных компонентов: белков, липидов, аминокислот, витами-

нов, ферментов, макро- и микроэлементов. Это определяет широкий спектр их лечебных свойств. Обладая достаточно высокой терапевтической активностью, они действуют мягче, физиологичнее синтетических лекарственных средств, характеризуются высокой степенью безопасности, а относительная дешевизна делает их доступными практически для всех социальных слоев населения [1]. Разработанная ингаляционная форма препарата имеет потенциальные преимущества над препаратами из той же группы для внутривенного применения, так как проникает в вентилируемые альвеолы.

Целью данного исследования явилось изучение механизмов действия смеси для ингаляций на основе маточного молочка пчел и прополиса – апингалина на модели отека легких.

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали 120 половозрелых крыс (самцов) массой 0,18-0,2 кг. Животные были получены из питомника лабораторных животных филиала «Андреевка» ФГБУН БМТ ФМБА России, Московская область.

Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) №1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР №775 от 12.08.77), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18 марта 1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Животные находились в одинаковых пластиковых клетках с поилками, получали полноценный экструдированный комбикорм и достаточное количество воды.

Животные были разделены на группы: *интактные* животные; *контроль* – животные, которым воспроизводили адреналовый отек легких (адреналин вводился внутривенно в дозе 0,5 мг/кг); *опыт* – животные, которым воспроизводили отек, а затем производилась курсовая ингаляция апингалина (10 дней по 10 мин.).

Органы забирались через сутки после прекращения эксперимента.

О наличии и выраженности отека судили по изменению весового коэффициента (ВК) и сухого остатка (СО) легких, рассчитываемых по следующим формулам: $(m \text{ влажных легких, в г}) / (m \text{ тела животного, в г}) = ВК$; $[(m \text{ сухих легких, в г}) / (m \text{ влажных легких, в г})] \times 100\% = СО$.

Морфологические изменения в легочной ткани исследовали методом световой микроскопии с помощью Biological Microscope MT 4200L (Meiji Techno, Япония). При окрашивании использовали гематоксилин-эозиновый краситель.

Активность процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в гомогенате легких диеновых (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и

оснований Шиффа (ОШ); окисленную модификацию белков – по уровню карбонильных производных.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента [5].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных экспериментов показали, что действие апингалина ($2,5 \times 10^{-4}$ г/мл) на изолированный препарат трахеи носило двухфазный характер: первая – кратковременная фаза сокращения препарата, а вторая – длительная – его расслабления (табл.).

Таблица

Изменение реакции (усл. ед) сокращения-расслабления препарата изолированной трахеи крыс после добавления в омывающий раствор апингалина и раствора Тироде

Средство	Фаза сокращения	Фаза расслабления
Раствор Тироде	отсутствует	отсутствует
Апингалин	0,5	7

Фармакологический анализ выявленных фаз действия апингалина показал, что механизмы сокращения гладких мышц трахеи сложны и основаны как на гистаминоподобном, так и холиномиметическом свойствах апингалина, поскольку сокращение блокировалось как Diphendramine, так и атропином.

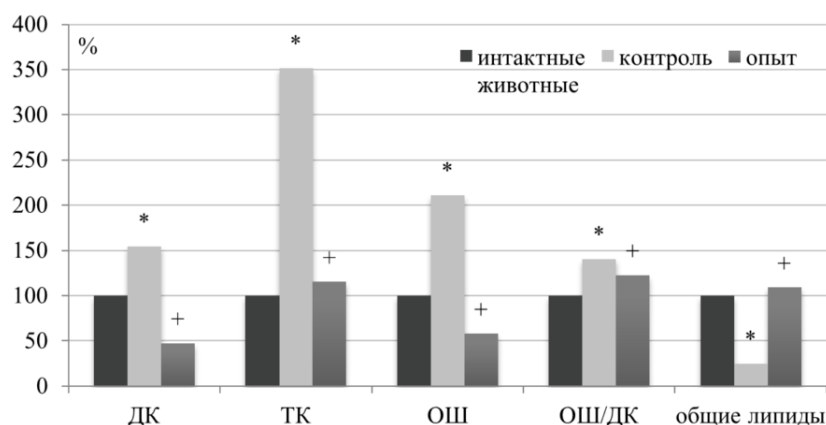
Длительная фаза расслабления, вероятно, связана с блокадой веществами, содержащимися в маточном молочке, адренорецепторов, что было подтверждено применением блокаторов рецепторов. Блокада α -адренорецепторов дигидроэрготамином (Dihydroergotamine – 3 мг/л), с последующим добавлением в барботируемый раствор апингалина, не вызвала видимых изменений фазы расслабления. Напротив, применение апингалина на фоне β -адреноблокатора (Propranololum – 0,5 мг/л) показало отсутствие реакции расслабления. Таким образом, можно заключить, что апингалин оказывает β -адренореактивное действие, вызывая расслабление мышц трахеи.

На экспериментальной модели адреналового отека легких у крыс, имеющей в патогенезе воспалительную реакцию, через 30 мин после инъекции у лабораторных животных выявлялось достоверное увеличение ВК – в 3 раза по сравнению с группой интактных животных и существенное ($p < 0,05$) снижение СО легких.

На гистологических срезах легких (на уровне бронхов) выявлялись типичные критерии отека – в венах имелись явления образования эритроцитарных агрегатов в виде «монетных столбиков», появление отечной жидкости в ткани и повышение кровенаполнения капилляров.

Одним из возможных механизмов деструкции легочной ткани при выбранной нами экспериментальной модели отека легких является тканевая гипоксия, которая сопряжена с образованием активных форм кислорода (АФК), что провоцирует активизацию окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Установлено, что в легочной ткани увеличивалось количество ДК в 2 раза, ТК в 3 раза, ОШ в 2 раза, снижалась концентрация общих липидов в легких в 4 раза



Свободнорадикальные процессы приводят к изменениям содержания не только липидов, составляющих основу биомембран, но и белков.

Нами показано, что по сравнению с изучаемыми показателями в группе интактных животных статистически значимо увеличивается уровень продуктов деградации белковых молекул нейтрального характера, на 50%, и основного характера – на 28%.

Таким образом, можно утверждать, что при отеке легких под действием АФК образуются конечные продукты ПОЛ, непрерывное накопление которых дестабилизирует мембраны и способствует деструкции белков, а, следовательно, ухудшает работу клеток и субклеточных систем в тканях легких.

В опытной серии было установлено, что курсовая ингаляция апингалина полностью предотвращала проявление воспалительной реакции животных. Об этом свидетельствовало состояние легочной ткани: на 44% уменьшался ВК, а СО легких был сопоставим ($p > 0,05$) с таковым интактных животных. Гистологическая картина также свидетельствовала о положительном влиянии апингалина на легочную ткань. В просветах альвеол регистрировалось отсутствие отека жидкости, появление в просвете альвеол макрофагов, как отражение завершения воспалительного процесса.

Противовоспалительный эффект апингалина мог быть опосредован многочисленными эффекторными молекулами, содержащимися в прополисе и маточном молочке, которые с одной стороны активизируют монокины, лизосомальные ферменты, содержащиеся в макрофагах, что позволяет фагоцитировать антигены, с другой – являются антиоксидантами.

Курсовая ингаляция изучаемой смеси маточного молочка и прополиса привела к нормализации исследуемых показателей ПОЛ и ОМБ в ткани легкого. Так, количество ДК и ТК уменьшилось в 3 раза, ОШ – в 3,3 раза по сравнению с группой «отек», интенсивность ПОЛ, определяемая как отношение ОШ/ДК, снизилась на 11%, концентрация общих липидов выросла в 3,6 раза по сравнению с группой «отек» (рис.). Содержание окисленных форм белка в исследуемой ткани при всех изучаемых длинах волн снизилось в 3 раза.

по сравнению с уровнем у интактных животных. Интенсивность ПОЛ возросла на 37% по сравнению с таковой у интактных животных (рис.).

Рис. Влияние курсовой ингаляции смеси апингалина на интенсивность перекисного окисления липидов в ткани легкого крыс.

Примечание: ДК – диеновые конъюгаты, ТК – триеновые конъюгаты, ОШ – основания Шиффа;

(*) – $p < 0,05$ по сравнению с группой «интактные животные»;

(+) – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль».

Заключение

Выявленный защитный эффект курсовой ингаляции апингалином, по-видимому, опосредован повышением воздухопроницаемости крупных и средних бронхов, улучшением спирометрических характеристик. Это связано с влиянием препарата на гладкую мускулатуру бронхов с соответствующим расслаблением мышц. С другой стороны, при ингаляциях животным апингалин проникал в альвеолы из-за своей высокодисперсности (до 5 мкм) и оказывал непосредственное фармакологическое действие на слизистую бронхов и альвеол, оказывая противовоспалительный эффект.

Известно, что прополис и маточное молочко действуют как эффективные естественные биостимуляторы [4]. Это свойство отдельных компонентов изучаемого средства, комбинируясь, способствовало очищению альвеол от жидкости и белка и восстановлению тканей легких при моделируемой альтерации. Снижение содержания в тканях легких продуктов свободнорадикальных взаимодействий связано с наличием антиоксидантов в компонентах средства, о чем свидетельствует множество литературных источников [3, 6, 7]. Флавоноиды, кофейная и коричная кислоты, входящие в состав прополиса, способны подавлять образование супероксиданиона и прекращать перекисную окисление липидов [7]. И прополис, и маточное молочко содержат токоферол и аскорбиновую кислоту [1, 4, 6] – витамины-антиоксиданты. Они также могут утилизировать реакционноспособные метаболиты кислоты, защищая биомембраны [2].

Выводы

1. Действие препарата на основе маточного молочка пчел и прополиса на изолированный препарат трахеи имеет двухфазный характер: первая – кратковременная фаза сокращения препарата, а вторая – длительная – его расслабления, опосредованного через активацию β -адренорецепторов.

2. Курсовая 10-дневная ингаляция препарата апингалин снижала количество окисленных форм белка и препятствовала окислению липидов в ткани легкого крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Теория и средства апитерапии / В.Н.Крылов [и др.]. М.: Комильфо, 2007. 296 с.
2. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С.Тараховский [и др.]. Пушкино: Synchrobook, 2013. 310 с.
3. Duration-dependent hepatoprotective effects of Propolis extract against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats / M.Bhadoria [et al.] // *Adv. Ther.* 2007. Vol.24, №5. P.1136–1145.
4. Cavuşoğlu K., Yapar K., Yalçın E. Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice // *J. Med. Food*. 2009. Vol.12, №6. P.1286–1292.
5. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. 6th Edition. New York: McGraw Hill Professional, 2010. 520 p.
6. Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans / H.Guo [et al.] // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2007. Vol.53, №4. P.345–348.
7. Guo H., Kouzuma Y., Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein // *Food Chem.* 2009. Vol.113. P.238–245.

REFERENCES

1. Krylov V.N., Agafonov A.V., Krivtsov N.I., Lebedev

V.N., Burmistrov L.A., Oshevskiy L.V., Sokol'skiy S.S. *Teoriya i sredstva apiterapii* [Theory and means of apitherapy]. Moscow: Komil'fo; 2007.

2. Tarakhovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina* [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino: Synchrobook; 2013.

3. Bhadoria M., Nirala S.K., Shukla S. Duration-dependent hepatoprotective effects of Propolis extract against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Adv. Ther.* 2007; 24(5): 1136–1145.

4. Cavuşoğlu K., Yapar K., Yalçın E. Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *J. Med. Food* 2009; 12(6):1286–1292.

5. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. 6th Edition. New York: McGraw Hill Professional; 2010.

6. Guo H., Saiga A., Sato M., Miyazawa I., Shibata M., Takahata Y., Morimatsu F. Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 2007; 53(4):345–348.

7. Guo H., Kouzuma Y., Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chem.* 2009; 113:238–245.

Поступила 26.01.2015

Контактная информация

Василий Николаевич Крылов,

доктор биологических наук, профессор,

заведующий кафедрой физиологии и биохимии человека

и животных биологического факультета,

Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского,

603950, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23.

E-mail: kfg@bio.unn.ru

Correspondence should be addressed to

Vasiliy N. Krylov,

PhD, Professor, Head of Department of Physiology and Biochemistry

of Human and Animal of Biological Faculty,

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,

23 Gagarin Ave., 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation,

E-mail: kfg@bio.unn.ru