

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В.ПАЛЛАДИНА

На правах рукопису

ДУДОВ

Ігор Олександрович

ВДЖОЛИНЕ ОБНІЖЕННЯ КВІТКОВОГО ПИЛКУ:
БІОХІМІЧНІ ЕФЕКТИ В СИСТЕМІ ЕРИТРОНУ
ТА СТВОРЕННЯ БІОМЕДИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

03.00.23 - біотехнологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

ДВ 32.549

Дисертацією є рукопис.
Робота виконана в НВО "Цветень", Дніпропетровській медичній академії, УкрНДІ гастроентерології МОЗ України, Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України та в Українському науково-гігієнічному центрі МОЗ України.

Науковий керівник - доктор біологічних наук,
професор М.Ф.Стародуб

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук,
професор Г.О.Пхакадзе

доктор біологічних наук,
професор А.І'. Козлов

Провідна організація - Київський Національний
університет ім. Тараса Шевченка

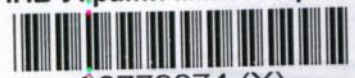
Захист відбудеться 26 червня 1995 року
о 19⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
за адресою: 252601, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту
біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

Автореферат розісланий 26 травня 1995р

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук Кирсенко Кирсенко О.В.

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00779074 (Y)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Продукти бджільництва є цінними не тільки для харчування. Вони використовуються і в профілактичній та лікувальній меті. Це стверджує народна медицина та досвід багатьох поколінь людей. Вони привертають увагу з боку вчених різного фаху і, перш за все, біологів та медиків. Якщо перші з них намагаються розкрити джерело біологічної дії продуктів бджільництва на організм та зрозуміти основні механізми цієї дії, то другі - намагаються знайти оптимальний алгоритм застосування їх на тлі практичної медицини.

Підтвердженням росту прискіпливої уваги вчених до продуктів бджільництва, до деякої міри, міг би служити факт регулярного проведення /1988, 1990, 1991 та 1993 роки/ Всесоюзних (в рамках тодішнього СРСР) та щорічних (починаючи з 1970 року) Міжнародних конгресів та симпозіумів по бджільництву та з питань апітерапії. Не дивлячись на це, ми ще далекі від науково обгрунтованого застосування продуктів бджільництва, не кажучи вже про встановлення наукових основ їх біологічного впливу на живі істоти. Залишається мало відомим і такий аспект, як вплив одночасного застосування окремих видів продуктів бджільництва та в разі комбінації їх з іншими патогенетично діючими агентами.

Гострота актуальності висвітлених питань стає вкрай зрозумілою враховуючи те, що препарати на основі продуктів бджільництва можуть мати більшу ефективність лікувально-профілактичної дії, ніж традиційні фізико-хімічні фактори. Це розуміння ще більше підсилюється, зважаючи на погляд з сьогодення, а саме, враховуючи, по-перше, наростаюче хімічне забруднення довкілля, що робить дуже часто небажаним вживання ліків штучного походження (при залобіганні додаткового деструктивного впливу), і, по-друге, необхідність забезпечення підсилення лікувальної дії фізико-хімічних факторів за рахунок зниження їх загальної токсичності. Ще один фактор, який підсилює гостроту актуальності проблеми по використанню продуктів

бджільництва в медицині, пов'язаний з відсутністю традиційних ліків штучного походження з причини сьогоденних економічних труднощів. Все це послужило основою, так званого, "буму" в народній медицині, враховуючи і використання препаратів на основі продуктів бджільництва. І знову ж таки встає проблема наукового обґрунтування та відповідного спрямування у використанні засобів народної медицини.

Мета та завдання дослідження: Метою даної роботи було вивчити вплив бджолиного обніжжя квіткового пилку на деякі показники структурно-метаболічного стану еритроцитів та рівень гуморального і клітинного імунітету, а також розробити ряд біотехнологічних препаратів на основі цього продукту бджільництва.

Для досягнення цієї мети необхідно було виконати такі завдання:

- 1) Охарактеризувати склад та деякі фізико-хімічні особливості бджолиного обніжжя квіткового пилку;
- 2) Проаналізувати вплив довгострокового вживання бджолиного обніжжя квіткового пилку на еритроцити за такими показниками:
 - а) резистентність до деструктивної дії кислоти;
 - б) стан системи гемоглобіну;
 - в) активність основних ферментів гліколізу та рівень 2,3-ДФГ в еритроцитах.
 - г) стан окисно-відновної системи;
- 3) Вивчити гуморальну імунну відповідь та гіперчутливість уповільненої дії (реакції ГУД) за умов довготривалого вживання бджолиного обніжжя квіткового пилку;
- 4) Розробити ряд біотехнологічних препаратів на основі продуктів бджільництва.

Наукова новизна роботи. В процесі виконання роботи отримано результати, що вказують на насиченість бджолиного обніжжя квіткового пилку біологічно-активними речовинами: майже всіма незамінними амінокислотами, ненасиченими жирними кислотами, враховуючи і арахідонову кислоту, та мікроелементами, серед яких за рівнем виділяється залізо, цинк та магній. Показано, що насиченість бджолиного обніжжя

квіткового пилку зазначеними речовинами залежить від рослин та часу медозбору, що робить необхідним сертифікацію цього препарату за фізико-хімічними показниками при використанні його з лікувально-профілактичною метою.

Вперше виконано багатопараметричне дослідження структурно-метаболического стану еритроцитів в умовах довготривалого вживання бджолиного обніжжя квіткового пилку інтактним організмом та на фоні токсичної дії на нього нітриту натрію в низьких концентраціях. Встановлено, що бджолине обніжжя квіткового пилку сприяє стабілізації популяційного складу еритроцитів з максимальним збереженням рівня активізованих популяцій червоних клітин. При цьому досягається високий рівень активного гемоглобіну внаслідок зниження окисних процесів та за рахунок перебування в циркуляції еритроцитів, наповнених гемоглобіном переважно HbA-типу. Під впливом бджолиного обніжжя квіткового пилку в еритроцитах відбувається активація таких ключових ферментів гліколізу як гексокіназа та фосфофруктокіназа. Разом з тим в них неспецифічно активується відновна система (збільшується вміст глутатіону та загальних SH-груп, підвищується активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази), а також блокуються окисні процеси (зменшується концентрація малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів).

Вперше, виходячи з аналізу первинної та вторинної імунної відповіді по рівню IgM та IgG на введення бичачого сироваткового альбуміну (BCA), а також, враховуючи дані по характеристиці інтенсивності реакції ГУД до еритроцитів барана, експериментально доведено, що бджолине обніжжя квіткового пилку проявляє імуномодуляторний ефект. Останнє пов'язане з стимуляцією гуморальної імунної відповіді та в зміні реакції ГУД, як показника стану Т-реактивної системи.

Практична цінність роботи. Розроблено та апробовано ряд біотехнологічних препаратів на основі бджолиного обніжжя квіткового пилку та інших продуктів бджільництва, а також препаратів з включенням біологічно-активних виїжок з трав. Запропоновано аліфатичні стероїди-

тичний комплекс та методику регуляції гомеостазу людини, вегетативно-судинної дистонії, атеросклерозу та остеохондрозу хребта. Розроблено препарат у формі крему для лікування простатиту та геморою. Запропоновано ряд препаратів у формі драже та відпрацьовані методики їх застосування для лікування та профілактики захворювань шлунку та дванадцятипалої кишки, печінки та підшлункової залози, порожнини рота та органів дихання, а також для зниження надмірної маси тіла.

Основні висновки дисертації використані при підготовці методичних рекомендацій ("Введение в апитерапию /учебное пособие для слушателей курсов/, Днепропетровск, 1992 та "Пчелы и доктор "Цветень" предлагают здоровье", Днепропетровск, 1995), призначених для лікарів, середнього медичного персоналу та інших фахівців, які займаються практичними питаннями апитерапії.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на наукових конференціях (м. Дніпропетровськ, 1990 та м. Паланга, 1992), на міжнародній конференції "Кислотний та температурний гомеостаз" (м. Сиктивкар, 1994), на щорічних наукових конференціях Дніпропетровської медичної академії та УкрНДІ гастроентерології МОЗ України.

Особистий вклад автора. В роботі наведено результати досліджень, виконаних безпосередньо автором. Медичне випробовування препаратів проведено лікарями за схемами та протоколами, складеними автором.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 10 робіт, 1 робота прийнята до друку та отримано 8 патентів України та Росії.

Структура та об'єм дисертації. Дисертація складається з наступних розділів: вступу, п'яти глав - "Огляд літератури", "Матеріали та методи", "Результати та обговорення", "Заклучна частина" висновків та списку використаної літератури, який включає 115 бібліографічних посилань. Роботу викладено на 111 сторінках машинопису, вона містить 14 таблиць та 4 рисунки.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Бджолине обніжжя було одержане в науково-виробничому товаристві

"Цветень", як результат весняного збору продуктів бджільництва з різнотрав'я степової зони південно-східної частини України. Його класифікували за методикою Г.Ермана (Младенов, 1984), зберігали герметично закритим в холодильнику, а перед використанням подрібнювали за допомогою подрібнювача ЗМ-ЗА.

Експерименти по вивченню стану біохімічних параметрів еритроцитів під впливом довготривалого живання тваринами бджолиного обніжжя квіткового пилку були проведені на статевозрілих (масою 120-160 гр.) білих безпородних щурів, серед яких було оформлено 4 групи (по 10 в кожній). Перша група була контрольною і включала інтактних тварин. В другій - були дослідні тварини, які отримували з їжею бджолине обніжжя по 100 мг в день протягом 1 місяця. Тварини третьої групи отримували нітрит натрію. Їм за 2 год перед дослідом вводили внутрішньочеревно водний розчин нітриту натрію в дозі 60 мг/кг маси тіла. Тварин четвертої групи готували як вказано для групи 2, але за 2 год перед дослідом їм вводили розчин нітриту натрію так, як і групі 3.

Лігандний спектр гемоглобіну характеризували спектрофотометрично /Benesch et al., 1973/, а його фракціонування здійснювали диск-електрофорезом у поліакриламідному гелі /Стародуб, 1979/. Резистентність еритроцитів вивчали методом кислотних еритрограм /Гительсон, Гершков, 1981/, а їх спорідненість до кисню визначали відповідно рекомендаціям /Шорохов, 1974/.

Про стан гліколізу судили виходячи з вивчення активності основних його ферментів: гексокінази (К.Ф.2.7.1.1), фосфофруктокінази (К.Ф.2.7.1.11), піруваткінази (К.Ф.2.7.1.40), які визначали спектрофотометрично за методом описаним /Beutler, 1971/. Рівень 2,3-ДФГ оцінювали відповідно рекомендаціям /Beutler, 1974/.

В гемолізатах еритроцитів визначали рівень загальних SH-груп, відновленого глутатіону /Фоломеев, 1981; Чернышев, 1983/, маломолекулового діальдегіду та дієнових кон'югатів /Fried, 1975/, активності супероксиддисмутази (К.Ф.1.15.1.1) /Fried, 1975/, глутатіонпероксида-

ви (К.Ф.1.11.1.9) /Гаврилова, Хмара, 1986/, а також каталази (К.Ф.1.11.1.6) та глутатіонредуктази (К.Ф.1.6.4.2) /Beutler, 1974/.

Рівень та спрямованість змін імунологічних показників під впливом бджолиного обніжжя квіткового пилку вивчали в експериментах на кроликах породи "Шиншила" (масою 2,5-3,0 кг). Серед них було сформовано 2 групи (по 8 тварин). В одній з цих груп були інтактні кролики, а в іншій - тварини, які 2 рази на день протягом 30 днів отримували з їжею бджолине обніжжя по 100 мг на 1 кг маси тіла. Кожна з цих груп в свою чергу була поділена на 2-і підгрупи (по 4 тварини), яких було імунізовано БСА або ж еритроцитами барана (ЕБ). Про рівень гуморальної імунної відповіді судили по вмісту утворюваних Igm та IgG при первинній та вторинній імунізації кроликів БСА. Останній вводили два рази в кількості 5 мг на тварину в повному ад'юванті Фрейнда з інтервалом 1 місяць. Кількість Igm та IgG встановлювали за допомогою методу ELISA з використанням мічених перекисидозом антитіл до ізотипових імуноглобулінів. Реакцію ГУД проводили відповідно Slula et al., 1992.

Амінокислотний склад бджолиного обніжжя визначали за допомогою автоматичного аналізатора амінокислот Міхгом-9 (Японія) [Дзвені, Тергей, 1976], вміст жирних кислот, мікроелементів, загального білку, жирів, вуглеводів встановлювали за рекомендаціями Пляшкова (1980). Біологічну активність бджолиного обніжжя визначали по відношенню до рослинних клітин за методом Кулаєвої (1973).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Склад та деякі фізико-хімічні особливості бджолиного обніжжя квіткового пилку. Привертає на себе увагу високий вміст в них проліну, оксипроліну, таурину, фосфоетаноламіну, гама-аміноасляної кислоти, глутаміну, лізину, аспарагіну, аргініну, цистеїну та метіоніну. Серед жирних кислот, що виявляються в бджолиному обніжжі квіткового пилку, в найбільшій кількості зустрічається арахідонова та пальмітинова кислоти. На фоні високого вмісту лужноземельних

елементів виявлений високий рівень заліза, цинку та магнію. Цікаво, що в соматичних рослинних клітинах арахідонова кислота, як правило, не зустрічається і тому необхідність організму у ненасичених кислотах задовільняється або ж за рахунок інших ненасичених кислот рослинного походження, наприклад, ліноленової, або ж за рахунок арахідонової кислоти тваринного походження /Страйер, 1985/.

Характеристики бджолиного обніжжя квіткового пилку суттєво змінюються від того, з яких рослин іде медозбір та в який період він відбувається (раннього чи пізнього літа). Отримані дані вказують, що і для дослідження, і для практичного застосування з лікувальною і профілактичною метою важливе значення набуває сертифікація цього препарату за фізико-хімічними показниками, принаймні за часом медозбору та виду рослин, використаних для цього.

Вивчення резистентності червоних кров'яних клітин щурів після довгострокового вживання бджолиного обніжжя квіткового пилку. Аналіз кривих гемолізу еритроцитів досліджуваних груп тварин показав, що еритрограми щурів 2-ї групи відрізняються від тих, які виявлені при аналізі еритроцитів тварин 1-ї групи, а саме, зміщенням кривої вправо, що свідчить про зростання вмісту в крові популяцій клітин з підвищеною стійкістю до дії гемолітичного фактора (рисунок). Причому в крові збільшується кількість клітин з максимальною та "середньою" стійкістю. Це вказує на формування в циркулюючій крові активізованих еритроїдних популяцій при відносному зниженні кількості як старих, так і негрілих еритроїдних елементів, особливо, з прискореним диференціюванням.

Як і чекалось, під впливом нітриту натрію спостерігається "лівий" зсув на еритрограмі, який вказує на суттєве зниження рівня резистентності червоних клітин під впливом хімічного агента. Можливо, це пов'язано з наростанням окисних процесів, які дестабілізують мембрани клітин. Важливо відмітити, що зазначене вище "ліве" зрушення на еритрограмі, виражене в значно меншій мірі у випадку дослідження:

тварин групи 4. Не виключено, що спостеріганий ефект ослаблення деструкуючого впливу нітриту натрію відбувається за рахунок попередньої активації відновного потенціалу клітин. Таким чином, тривале вживання тваринами бджолиного обніжжя квіткового пилюку веде до стабілізації популяційного складу еритроїдних елементів внаслідок збереження в циркуляції активно функціонуючих клітин (клітин з високою стійкістю до гемолітичного фактору). Це пов'язано, напевне, з ослабленням інтенсивності процесів окислення в організмі. Останнє підтверджується даними, отриманими при вивченні стану Hb та окисно-відновної системи еритроцитів.

Система Hb у тварин, які довготривало вживали бджолине обніжжя квіткового пилюку. Дослідження показали (табл.1), що у тварин, які довготривало вживали бджолине обніжжя (група 2), в порівнянні з інтактними тваринами (контрольна група 1) вміст загального Hb дещо вище. Одночасно у них спостерігається і менший рівень як метгемоглобіну (MtHb), так і оксигемоглобіну (HbO₂), а вміст дезоксигемоглобіну (дезоксигемоглобіну), навпаки, підвищений.

Під впливом нітриту натрію в крові різко наростає кількість MtHb



Кислотні еритрограми інтактних тварин (1), а також тварин, які довготривало вживали бджолине обніжжя квіткового пилюку (2) та підданих дії нітриту натрію до (3) і після вживання бджолиного обніжжя (4). По осі ординат - процент гемолізованих клітин, по осі абсцис - час в хвиликах.

при незмінному рівні загального Hb та зниженні вмісту як HbO_2 , так і дезокси-Hb (тварини групи 3). Важливо відмітити, що ці процеси менш виражені для тварин, які на протязі місяця вживали бджолине обніжжя перед введенням їм розчину нітриту натрію (група 4). Рівень фракцій 5 та 6, а також фракцій 1 і 2 (які відповідно даним Стародуба та інш. (1979) є аналогами HbF та HbA1 відповідно) достовірно знижений у тварин групи 2 в порівнянні з тваринами групи 1. Одночасно вміст фракції 3 (відповідно HbA0) дещо збільшений. Привертає увагу, що різниця між групами 3 і 4 виявлена лише по вмісту фракцій 1, 2 та фракції 3. Така ж ситуація зберігається і при порівнянні гетерогенності Hb тварин групи 1 та 2.

Отримані дані свідчать про те, що при нітритній інтоксикації спостерігається утворення конформерів Hb, які і поповнюють фракції 1 та 2 за рахунок зниження рівня Hb у фракції 3. Такі ж зміни в гетерогенній системі Hb не є специфічними і спостерігаються під впливом різного виду фізико-хімічних факторів на організм (Стародуб, 1982). Те, що довготривале згодовування тваринам бджолиного обніжжя приводить до зменшення кількісного вмісту фракцій 1 та 2 і одночасному підвищенню рівня Hb у фракції 3, напевне, вказує на зниження під його впливом окисної дії на біоструктури, враховуючи як червоні клітини, так і молекули Hb. Особливу цікавість представляють дані про зменшення вмісту фракцій 5 та 6 в Hb тварин групи 2. Ці дані, можливо, відображають процеси, які пов'язані з інтенсивністю зміни популяційного складу еритроцитів і, в більшій мірі, в швидкості формування еритроїдними попередниками термінальних стадій свого розвитку.

Враховуючи дані (Стародуб та інш., 1980) про зміну максимумів синтезу окремих фракцій Hb в ході диференціювання еритроїдних елементів, слід вважати, що інтенсивність "омоложення" популяцій червоних клітин у тварин групи 2 менша, ніж у тварин контрольної групи 1. Крім того, відомо (Boyer et al., 1975), що еритроцити наповнені HbF, менш стійкі до дії гемолітичних факторів, ніж еритроцити, що

вміст НbA. Те ж саме стосується і еритроцитів шурів з різним рівнем фракцій 5, 6 та 3 [Стародуб, Грицак, 1979]. Приймаючи до уваги ці відомості та наші експериментальні дані, є воі підстави вважати, що у тварин, довготривало вживавших бджолине обніжжя, відсутня напруженість еритропоезу. Причому це відмічається на тлі дещо більшого рівня загального Нb в крові, ніж у тварин контрольної групи.

Табл. 1

Величина р50, вміст тотального Нb, його лігандний та фракційний склад в крові інтактних тварин (1), тварин, довготривало вживавших бджолине обніжжя квіткового пилку (2), підданих дії нітриту натрію до (3) та після вживання бджолиного обніжжя (4).

Біохімічні показники:	Групи тварин / $M \pm m$			
	1	2	3	4
Тотальний Нb, г/100мл	12,3±0,3	13,9±0,3	12,1±0,2	13,8±0,4
Лігандні форми, % :				
HbO ₂	84,4±0,8	80,4±1,6	76,1±2,9	85,4±1,6
дезоксi-Нb	8,1±0,7	18,4±1,5	1,1±0,6	4,0±0,8
MtHb	7,5±0,6	3,2±0,4	22,3±2,8	10,6±1,4
Фракції, % :				
1	8,6±0,4	6,8±0,6	11,9±0,7	9,1±0,8
2	10,9±1,2	7,2±1,0	19,0±0,7	15,2±0,8
3	43,0±1,2	46,6±1,1	32,1±0,8	39,2±0,9
4	18,4±0,5	23,5±0,5	19,2±0,6	19,4±0,5*
5	13,8±0,1	11,4±0,6	13,3±0,3	13,0±0,4*
6	5,1±0,1	4,4±0,2	4,9±0,3	4,9±0,2*
р50, мм рт.ст.	2,2±0,1	1,9±0,2*	2,6±0,3	2,0±0,3*

* - Різниця статистично невірогідна.

Нами встановлено, що з врахуванням поправки на рівень $MtHb$, величина $p50$ для Hb , виділеного з крові обстежених груп тварин, практично не змінюється. Правда, привертає увагу дещо більша спорідненість до кисню Hb у тварин групи 2, але різниця з Hb контрольної групи статистично невірогідна. Можливо, це обумовлено двома причинами, які мають взаємопротилежний характер. По-перше, вміст фракцій 5,6 в тотальному Hb , як було показано вище, зменшується при одночасовому збільшенні фракції 3, які за спорідненістю до кисню різняться так, що величина $p50$ зсувута в область більш низьких парціальних тисків для фракції 3 в порівнянні з тією, яка притаманна для фракцій 5 та 6 (Стародуб та інш., 1980). По-друге, встановлена різниця не настільки значна, а чутливість методу не дозволяє з високою вірогідністю отдиференціювати зміни, пов'язані з незначними перебудовами в фракційному складі Hb . Справедливість такого припущення підтверджується порівнянням даних, отриманих для Hb тварин, довготривало вживавших бджолине обніжжя, та тварин, які піддавалися впливу нітриту натрію без вживання цього обніжжя (групи 2 та 3), між якими є достовірна різниця за величиною $p50$ і для яких притаманні зміни в гетерогенному спектрі Hb протилежного характеру.

Активність основних ферментів гліколізу та рівень 2,3-ДФГ в еритроцитах. Результати проведених досліджень показали, що активність гексокінази у тварин контрольної групи досягав величини $9,65 \pm 0,30$. У тварин, що отримували на протязі місяця бджолине обніжжя (2-а група), активність цього ферменту дещо вища (приблизно на 12,3%). Таке ж співвідношення між вказаними групами нами виявлено і у випадку ферменту фосфофруктокінази. Величини, що характеризують активність цього ферменту склали відповідно $40,32 \pm 1,25$ та $46,44 \pm 1,41$. Дещо інша картина при порівнянні зазначених груп тварин спостерігається у випадку аналізу активності піруваткінази. Виявилось, що в обох групах її активність суттєво не різниться і досягає рівня величини 140.

В 1 мл еритроцитів крові тварин контрольної групи міститься 5,5

мікролей 2,3-ДФГ. Його рівень збільшений в еритроцитах крові тварин, довготривало отримуваних бджолине обніжжя.

Стан окисно-відновної системи еритроцитів. Аналіз рівнів відновленого глутатіону та загальних SH-груп в еритроцитах інтактних тварин та тварин, які довготривало вживали бджолине обніжжя, (1-а та 2-а групи відповідно) свідчить про їх зростання під впливом цього препарату (табл. 2). Привертає увагу те, що одночасно спостерігається підвищення активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Вірогідно, наростання субстрату глутатіонпероксидази відновленого глутатіону обумовлює активацію цього ферменту. Разом з тим, не виключено, що активація глутатіонредуктази викликана безпосереднім впливом продуктів бджолиного обніжжя на систему її регуляції та/або прояв активності. В кінцевому підсумку це сприяє накопиченню відновлених еквівалентів у вигляді глутатіону. Безумовно, можна припускати, що ріст рівнів відновленого глутатіону та загальних SH-груп є результатом зниження інтенсивності процесів окислення пероксидними радикалами. Деструктивна дія останніх залежить від активностей в системі таких ферментів як каталаза та супероксиддисмутаза.

В еритроцитах шурів, які довготривало вживали бджолине обніжжя, активність вказаних вище ферментів хоч і збільшується, але це збільшення статистично невірогідне. Все ж, можливо, нарощування рівня відновлених SH-груп в еритроцитах є результатом комплексного впливу як на інтенсивність генерування пероксидних радикалів, так і на активність каталази та супероксиддисмутази - основних ферментів, що приймають участь в їх деструкції. Як наслідок такого впливу бджолиного обніжжя, треба вважати, є зниження вмісту в еритроцитах малонового діальдегіду та дієнових конюгатів.

Таким чином, отримані нами дані свідчать про те, що під впливом бджолиного обніжжя в еритроцитах шурів активується антиокислювальна система та знижується інтенсивність процесів окислення.

Загалом бджолине обніжжя сприяє накопиченню активно функціону-

вчого Hb в червоних клітинах та стабілізації популяційного складу еритроцитів. Весь комплекс отриманих даних про структурно-метаболический стан еритроцитів вказує на те, що бджолине обніжжя впливає на адаптивні можливості організму неспецифічно, підвищуючи стійкість організму до дії факторів середовища.

Табл. 2

Деякі показники стану перекисного окислення ліпідів та системи антиоксидантного захисту еритроцитів до (1) та після (2) довготривалого вживання тваринами бджолиного обніжжя квіткового пидку (M±m; n=10).

Показники	1	2
Відновлений глутатіон, ммоль	6,6±1,1	10,3±1,3
Загальні SH-групи, ммоль	30,2±2,7	40,1±3,1
Малоновий диальдегід, ммоль	1,4±0,08	0,9±0,1
Дієнові кон'югати, ммоль	10,8±1,2	7,7±0,9
Каталаза, MEx10 ⁴	2,8±0,3	3,9±0,5*
Супероксиддисмутаза, UEx10 ⁴	2,1±0,2	2,6±0,3*
Глутатіонпероксидаза, ммоль		
GSH в хв.	1,6±0,1	2,2±0,2
Глутатіонредуктаза, ME	8,3±0,6	10,4±0,7

*-Результати статистично невірідні.

Гуморальна імунна відповідь та гіперчутливість уповільненої дії.

Результати досліджень, які представлені в табл.3, показують, що рівень IgM в крові кроликів обох груп значно вищий після першої імунізації, ніж після повторної. Разом з тим зміни у вмісті IgG в ході імунізації носять протилежний характер. Отримані дані узгоджуються з сучасним уявленням про формування гуморальної імунної відповіді та віддзеркалюють динаміку зміни ізотипового набору антитіл в цій

ситуації. Особливу цікавість являє те, що рівень обох ізотипових антитіл суттєво вище у тварин, які довготривало отримували бджолине обніжжя, ніж у тварин контрольної групи. Важливо відмітити, що різниця між вивчаємими групами тварин значно більше проявляється по рівню IgG, ніж IgM. Отримані дані свідчать, що бджолине обніжжя підвищує імунореактивність організму, стимулюючи гуморальну імунну відповідь на екзогенний білковий антиген. Аналіз інтенсивності реакції ГУД показує, що під впливом бджолиного обніжжя вона знижується в середньому на 30 - 40 % у кроликів дослідної групи в порівнянні з тією, яка знайдена у тварин контрольної групи. Ці дані свідчать про зміни в системі клітинного імунітету та, вірогідно, вказують на зрушення балансу, що є між ефektorними та супресорними клітинами.

На базі отриманих даних ми не можемо судити про характер та спрямованість змін в клітинній імунній відповіді. Вся сукупність представлених результатів дозволяє лише однозначно стверджувати, що бджолине обніжжя квіткового пилку є імуномодулятором. Останнє проявляється в стимуляції під його впливом гуморальної імунної відповіді, а також в зміні реакції ГУД, як показника стану Т-реактивної системи.

Біотехнологічні препарати на основі продуктів бджільництва.

1. Апфітотерапевтичний комплекс та методика регуляції гомеостазу людини, вегетативно-судинної дістонії, атеросклерозу та остеохондрозу хребта. Цей комплекс включає бджолине обніжжя квіткового пилку, мед, 4% спиртову настоянку прополісу, фітобальзам "Росцвет" для внутрішнього вживання та крем "Масажний" для проведення масажу /Дудов та ін., 1993а/. До складу крему входять: бджолиний віск, прополіо, бджолиний яд, камфорне масло, димексид, настоянка хрину /Дудов та ін., 1993б/.

Елементи апфітотерапевтичного комплексу застосовують слідуючим чином. 1) Бджолине обніжжя квіткового пилку вживають в суміші з медом (1:1) 2 рази на день перед їжею (вранці та ввечері) по 1 столо-

вій ложці, розмішуючи в 50-100 мл теплої води. 2) Одночасно вживають 3 рази на день за 30 хв. до їжі фітобальзам "Росцвет" по 5-7 крапель разом з такою ж кількістю 4% спиртової настоянки прополісу, внесених в 50-100 мл теплої води. 3) Використовуючи 8-10 гр. крему "Масажний", проводять кожний день масаж за таким планом: а) послідовно діють на паравертебральні зони крижових, поперекових, грудних та шийних сегментів; б) визначають та масажують больові зони міжостотних проміжків паравертебральних зон; в) проводять вибіркового масаж нижніх кінцівок, воротникової зони, зони ключиці, грудних та верхніх кінцівок. Загальна тривалість процедури масажу сягає 30-35 хв. Курс складається з 15 процедур, що проводяться кожний день або ж через день. Через 1 та 3 тижні можливі загострення, але курс в цьому випадку слід закінчити, неперериваючи.

Табл. 3

Інтенсивність реакції ГУД проти ЗВ та рівень специфічних ізотипних антитіл до ВСА в крові кроликів до (1) та після довготривалого вживання бджолиного обліжя квіткового пилю (2), М±m; n=4.

Аналізуваний показник	Групи тварин	
	1	2
Інтенсивність реакції ГУД, %	100	65
Рівень специфічних антитіл, мкг/мл:	Перша імунізація	
IgM-типу	3,1±0,8	6,5±1,0
IgG-типу	28,0±4,0	57,9±5,0
	Повторна імунізація	
IgM-типу	1,4±0,5	3,9±0,7
IgG-типу	89,3±7,1	192,0±16,0

Запропонований апіфітотерапевтичний комплекс розрахований на 2 курси: одноразовий 24-х денний та підтримуючий. Перший з них рекомендується людям середнього віку та з середнім ступенем гомеостатичних дисфункцій і помірними проявами вегетосудинної дистонії, атеросклерозу та остеохондрозу хребта. Він виправданий в стаціонарних, амбулаторних та санаторно-курортних умовах, а також в профілакторіях та домашніх умовах. Другий курс спрямований на людей старшого віку з вираженими гомеостатичними дисфункціями та значними проявами захворювань. Його проводять 24-х денними курсами кожен рік і на протязі 4-5 років.

2. Крем "Інтим". До складу крему входить прополіс (8-9 частин), віск (16-20 частин), соснова живиця (16-20 частин), мед (10-12 частин), бджолине обніжжя квіткового пилку (20 частин), спирт етиловий ректифікат (10-12 частин), вода (10-12 частин) та основи /Дудов та інш., 1993в/. Він проявляє протирапальні, болевгамовуючі, спазмолітичні, кератолітичні, антисептичні та протирудні властивості, а також ефективно утамовує кров та підвищує статеву потенцію. Показання до застосування включають: простатит, геморої. Ректальний масаж при простатиті проводять через день, а замазування гемороїдальних вузлів кожний день. Використовують 3-5 гр. крему. Його можна вводити у вигляді свічок. На курс лікування випадає 8-10 процедур. Протипоказанням до його застосування може бути лише підвищена чутливість осіб до продуктів бджільництва. Крем не має побічної дії у нього ні відносно хворого, ні у масажиста (на протигагу крему "Масажний").

3. Методика застосування лікувально-профілактичних препаратів у формі драже. Загальний склад драже має такий вигляд /Дудов та інш., 1993г/: а) бджолине обніжжя квіткового пилку (як основний наповнювач); б) настій лікарських трав (який може змінюватись в залежності від спрямованості дії препарату), в) цукрова пудра (28-29 частин), г) патока крохмальна (2-3 частини), д) мед квітковий (3-5 частин), ж) пудра глюкози кристалічної (10-12 частин), з) барвники харчові.

За таким складом нами були розроблені варіанти драже, в яких

аміновався лише набір лікарських трав відповідно його спрямованості. Драже та методику їх застосування запропоновані для лікування та профілактики захворювань шлунку та дванадцятипалої кишки, печінки та підшлункової залози, порожнини рота та органів дихання, а також для зниження абиткової маси тіла.

ВИСНОВКИ

1. Охарактеризовано склад бджолиного обніжжя квіткового пилку та встановлена його насиченість біологічно-активними речовинами: майже всіма незамінними амінокислотами, ненасиченими жирними кислотами, враховуючи і арах. донову кислоту, та мікроелементами, серед яких за рівнем виділяється залізо, цинк та магній.

2. Показано, що насиченість бджолиного обніжжя квіткового пилку залежить від рослин та часу медозбору, що робить необхідним сертифікацію цього препарату за фізико-хімічними показниками при використанні його з лікувально-профілактичною метою.

3. Вперше виконане багатопараметричне дослідження структурно-метаболічного стану еритроцитів в умовах довготривалого живання бджолиного обніжжя квіткового пилку інтактним організмом та на фоні токсичної дії на нього нітритів натрію в низьких концентраціях. На основі цього дослідження стверджується, що бджолине обніжжя квіткового пилку впливає на адаптивні можливості організму, підвищуючи його стійкість до дії факторів середовища, оскільки:

а) встановлено, що бджолине обніжжя квіткового пилку сприяє стабілізації популяційного складу еритроцитів з максимальним збереженням рівня активізованих популяцій червоних клітин. При цьому досягається високий рівень активного гемоглобіну внаслідок зниження окисних процесів, та за рахунок перебування в циркуляції еритроцитів, наповнених Hb переважно HbA-типу;

б) виявлено, що при довготривалому живанні бджолиного обніжжя квіткового пилку відбувається активація таких ключових ферментів

гліколізу, як гекоокіназа та фосфофруктокіназа;

в) під впливом бджолиного обніжжя квіткового пилку збільшується вміст глутатіону та загальних SH-груп і підвищується активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази, а також зменшується в еритроцитах концентрація малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів.

4. Вперше, виходячи з аналізу первинної та вторинної імунної відповіді за рівнем вмісту IgM та IgG на введення БСА, а також на основі вивчення інтенсивності реакції ГУД до ЕБ, доведено, що бджолине обніжжя квіткового пилку проявляє імуномодуляторні властивості.

5. Розроблено та апробовано ряд біотехнологічних препаратів на основі бджолиного обніжжя квіткового пилку та інших продуктів бджільництва, а також з включенням біологічно-активних витяжок трав:

а) запропоновано аніфітотерапевтичний комплекс та методику регуляції гомеостазу людини, вегетативно-судинної дистонії, атеросклерозу та остеохондрозу хребта;

б) розроблено препарат у формі крему для лікування простатиту та гемороя;

в) запропоновано ряд препаратів у формі драже та відпрацьовані методики їх застосування для лікування та профілактики захворювань шлунку та дванадцятипалої кишки, печінки та підшлункової залози, порожнини рота та органів дихання, а також для зниження збиткової маси тіла.

ОСНОВНІ РОБОТИ, ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Блонокая В.Н. Губа П.Л. Дворецкий А.И. Дудов И.А. Крот Е.И. Тарасов В.В. Черкасова А.И. Медоносные растения Украины (справочник). // Госкомнарообразования СССР, ДГУ, Днепропетровск, 1980г.
2. Дудов И.А. Кладчук В.В. Лосяной В.И. Моренец А.А. Окотский В.А. Сивоненко Н.С. Фишпов Ю.А. Школьник В.М. Введение в апитерапию

(учебное пособие для слушателей курсов). // НПАО <<Цветень>>
Днепропетровск.-1992.

3. Дудов И.А., Стародуб Н.Ф. Антиоксидантная система эритроцитов крыс в условиях длительного приема пчелиных обножек цветочной пыльцы. Украинский биохимический журнал, 1994, т.66, №6, с.94-96.
4. Дудов И.А., Моренец А.А., Артох В.П., Стародуб Н.Ф. Иммуномодуляторный эффект пчелиных обножек цветочной пыльцы. Украинский биохимический журнал, 1994, т.66, №6, с.91-93.
5. Стародуб Н.Ф., Дудов И.А., Моренец А.А., Артох В.П., Терновой К.С. Состояние гемоглобина, основных ферментов гликолиза и антиоксидантной системы эритроцитов крыс в условиях длительного приема пчелиных обножек цветочной пыльцы. Материалы Международной конференции "Кислотный и температурный гомеостаз", Сыктывкар, 1994.
6. Дудов И.А., Моренец А.А., Артох В.П., Стародуб Н.Ф. Состояние гемоглобина и резистентность красных кровяных клеток крыс после длительного приема пчелиных обножек цветочной пыльцы. Доп.НАН 1995, №2, с. 104-106.
7. Дудов И.А., Моренец А.А., Артох В.П., Стародуб Н.Ф. Активность основных ферментов гликолиза и уровень 2,3 дифосфоглицерата в эритроцитах. Доп.НАН 1995, №3, с. 104-106.
8. Дудов И.А., Моренец А.А., Клячук В.В., Филиппов Ю.А., Арделян В.Н., Школьник В.М. Пчелы и доктор "Цветень" предлагают здоровье. Днепропетровск, 1995, 35с.
9. Дудов И.А., Панков В.А., Филиппов Ю.А., Дунай Л.И., Черкасова А.И., Дудова А.Ф., Слетков С.В. Информационное письмо. Апитерапевтический комплекс в профилактике и лечении вегетативно-сосудистой дистонии, атеросклероза и остеохондроза позвоночника. Выпуск 1, по проблеме "Неврология", Днепропетровск, 1993.
10. Starodub N.F., Dudov I.A., Morenetz A.A. Biochemical basis of erythron system adaptation at the apitherapy by pollen bee.

Thes. of First. Europ. Cong. of Pharmacol., Milan, Italy, 1995.

11. Dudov I.A., Morenetz A.A., Arthjuch V.P., Nazarenko V.I., Starodub N.F. Activity of main glycolysis enzymes, hemoglobine state and erythrocyte redox system of rats in case of long time consumption of pollen bee. Amer. bee J. (in press).
12. Дудов І.А., Дунай Л.І., Філіпов Ю.О., Черкасова А.І. Крем для профілактичного і лікувального масажу при остеохондрозах і поліартриті. // Патент України. 589 від 15.03.93. М. Кл. А6 1К35/64.
13. Дудов І.А., Донченко Ю.В. Спосіб одержання перги із пергових сотів. // Патент України 1653 від 15.10.93. М. Кл. А01К50/00.
14. Дудов І.А., Філіпов Ю.О., Моренець О.О., Дунай Л.І. Засіб для лікування геморою, тріщин анального отвору, хронічного простатиту та початкових стадій аденоми передміхурової залози. // Патент України 587 від 15.03.93. М. Кл. А6 1К35/64.
15. Дудов І.А., Філіпов Ю.О., Дунай Л.І., Леонова О.А. Драже. // А2363/00.
16. Дудов І.А., Філіпов Ю.О., Моренець О.О., Дунай Л.І. Драже-дезодорант за доглядом порожнини рота. // Повідомлення про видачу патенту України N 93111616 М. Кл. А6 1К7/16.
17. Дудов І.А., Донченко Ю.В., Долгополов О.В. Спосіб одержання чистого нативного прополісу і прополісної води. // Повідомлення про видачу патенту України N 93101279 М. Кл. А6 1К35/64.
18. Дудов І.А., Черкасова А.І. і др. Пчелинне обножки (цветочная пыльца). // Республіканський стандарт України РСТУССР 1999
19. Дудов І.О., Філіпов Ю.А., Черкасова А.І., Дунай Л.І. Засіб лікування гострих та хронічних ринітів та гайморитів. Повідомлення про видачу патенту України N93101279, М.Кл. А61К35/64.

Дудов І.О. Бджолине обніжжя квіткового пилку: біохімічні ефекти в системі еритрону та створення біомедичних препаратів.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.23 - биотехнология, Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 11 научных работ и 8 патентов, которые посвящены изучению влияния длительного приема животными пчелиных обножек цветочной пыльцы на структурно-метаболическое состояние эритроцитов, гуморальный и клеточный иммунитет. Исследования проведены на интактных животных и животных, подвергнутых воздействию малых доз нитрата натрия. Разработаны и апробированы ряд биотехнологических препаратов на основе пчелиных обножек цветочной пыльцы и других продуктов пчеловодства, а также препаратов с включением биологически-активных веществ трав.

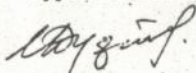
Ключові слова: бджолине обніжжя квіткового пилку, еритронон, еритроцити, гуморальна імунна відповідь, реакція гіперчутливості уповільненої дії, біотехнологічні препарати.

Dudov Igor O. Bee-pollen: biochemical effects in the erythron system and development of biomedical preparations.

Candidate of Sciences Dissertation, specialization 03.00.23 -Biotechnology, A.V.Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1995.

The materials are to be defended contained in 11 scientific papers and 8 ukrainian and russian patents concerning investigation of long-term influence of bee-pollen on the structural-metabolite state of erythrocytes and on the level of cell and humoral immunity. Investigations were fulfilled with the usage of intact animals and animals exposed to influence of low dose of sodium nitrate. The number of biomedical preparations on the basis of bee-pollen, others bee-keeping products and with the usage of biological active substances of officinal herb were created.

Key words: bee-pollen, erythron, erythrocytes, humoral immune response, delayed-type hypersensitivity, biotechnological preparations.



AB 32.549