

Н.В. Валитова, С.Ф. Колосова

Восточно-Казахстанский государственный технический университет им. Д. Серикбаева, Усть-Каменогорск, Казахстан
(E-mail: Valitova-N@mail.ru)

Противотуберкулезная активность продуктов пчеловодства в опыте *in vivo*

В статье приведены результаты доклинических исследований эффективности спиртового бальзама на основе продуктов пчеловодства в сравнении и в комплексе с классическими противотуберкулезными препаратами основного ряда при лечении экспериментального туберкулеза морских свинок, зараженных чувствительным музейным штаммом микобактерии (H37RV). Эксперимент проводился на базе референс-лаборатории Национального научного центра фтизиопульмонологии РК (г. Алматы) согласно методическим указаниям по изучению противотуберкулезной активности фармакологических веществ и их химиотерапевтической эффективности в опытах *in vivo*. Установлено, что использование спиртового бальзама в монотерапии не приводит к полному излечению, но способствует сдерживанию размножения бактериальной популяции в организме. При одновременном применении двух противотуберкулезных препаратов (изониазид и рифампицин) и спиртового бальзама на основе продуктов пчеловодства к концу опыта увеличивалась масса тела животных. Патоморфологические и гистологические исследования внутренних органов морских свинок, получавших лечение спиртовым бальзамом в комплексе с противотуберкулезными препаратами первого ряда, показали, что у них очагов туберкулезного воспаления на 12,5 % меньше, чем у экспериментальных животных, леченных только противотуберкулезными препаратами. Также в этой группе отмечено отсутствие гигантоклеточно-многоядерной инфильтрации в легких и центрального творожистого некроза в лимфоузлах и селезенке, наблюдались репарация и регенерация паренхимы и стромы исследованных органов.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии, опыт *in vivo*, противотуберкулезные препараты, продукты пчеловодства, химиотерапевтическая эффективность, *Galleria mellonella*, патоморфология, гистологические исследования, очаг туберкулезного воспаления.

Введение

Сегодня, когда современная наука достигла значительных результатов в различных областях, туберкулез (ТБ) продолжает оставаться большой проблемой мирового здравоохранения [1].

Составление новых комбинаций и схем лечения на основе известных противотуберкулезных препаратов (ПП), разработка новых химиотерапевтических средств, включение в терапию дополнительных физиопроцедур и/или препаратов не всегда позволяют добиться нужного терапевтического эффекта. Причиной тому является высокая устойчивость микобактерий туберкулеза (МБТ) к различным воздействиям, обусловленная особенностями строения защитной оболочки патогена, содержащей воскоподобные вещества.

В связи с этим еще одним направлением, в котором ведутся исследования, в том числе и авторами данной статьи, является разработка препаратов, снижающих резистентность МБТ за счет разрушения и/или изменения структуры их защитной оболочки.

Принципиально новый класс исходного биологически активного сырья с точки зрения снижения устойчивости МБТ к лекарственным средствам представляют личинки большой восковой моли (ЛБВМ). Это нетрадиционный продукт пчеловодства.

Большая восковая моль (*Galleria mellonella*) паразитирует в пчелиной семье. Личинки *G. mellonella*, основным элементом питания которых является воск, усваивают до 50 % содержащихся в нем продуктов. Они могут переваривать мирициловый эфир пальмитиновой кислоты и имеют такие специфические липазы, которых нет у других насекомых. [2]. Следовательно, это единственное насекомое, личинки которого могут переваривать воск, входящий в состав оболочки возбудителя туберкулеза [3].

Как объект для исследований ЛБВМ известны во всем мире. В странах СНГ в настоящее время ЛБВМ используются для производства препаратов различной терапевтической направленности. За рубежом ЛБВМ преимущественно используются в качестве модели и альтернативного хозяина для исследования фактора вирулентности различных патогенов и изучения иммунного ответа инфицированных бактериями личинок, так как система ЛБВМ функционально аналогична иммунной системе млекопитающих и обладает как гуморальным, так и клеточным иммунитетом [4].

Аналогичные опыты непосредственно с возбудителем ТБ в начале 20 века проводил российский ученый С.И. Метальников. Он вводил личинкам в полость тела различные дозы МБТ. Инфицированные личинки не погибали, а продолжали свое развитие, превращаясь во взрослое насекомое. При исследовании крови и внутренних органов ЛБВМ было установлено, что фагоциты личинок быстро захватывают и переваривают МБТ. И даже при введении большого количества МБТ уже через 2–3 суток они разрушаются, а зараженные личинки совершенно здоровы [5]. Это дало возможность предполагать, что препараты ЛБВМ обладают такими же свойствами.

Главным фактором патогенности МБТ является токсический гликолипид (корд-фактор), который располагается на поверхности и в толще клеточной стенки. По химической природе он представляет собой полимер, состоящий из одной молекулы дисахарида трегалозы и связанных с ней в эквивалентных соотношениях миколовой и миколиновой высокомолекулярных жирных кислот, а также фтиоцеролдимикоцерозатов. Корд-фактор оказывает токсическое действие на ткани и защищает МБТ от фагоцитоза, блокируя окислительное фосфорилирование в митохондриях макрофагов. *M. tuberculosis*, лишенные корд-фактора, являются непатогенными или слабopatогенными для человека и морских свинок [6].

Окрашивание нейтральным красным ослабленного в лабораторных условиях клинического изолята *M. tuberculosis* и непатогенных для морских свинок МБТ различного происхождения, выделенных из окружающей среды, дает отрицательную реакцию. Анализ липидов показал, что эти МБТ утратили способность синтезировать фтиоцеролдимикоцерозаты и другие клеточные липиды с разветвленной цепью, являющиеся основными факторами вирулентности *M. tuberculosis*, особенно на ранней стадии инфекции. Таким образом, отрицательная реакция при окрашивании является маркером вирулентности, указывает на важные нарушения в оболочке *M. tuberculosis* и снижение ее устойчивости к лекарственным средствам [7].

Вирулентный штамм *M. tuberculosis*, обработанный липидолитическими ферментами личинок *G. mellonella*, при окрашивании по Цилю-Нильсену становится менее кислотоустойчивым, а окрашивание нейтральным красным дает отрицательную реакцию, что говорит о влиянии препаратов ЛБВМ на оболочку МБТ. При этом останавливается или сильно замедляется рост МБТ, они временно теряют свою вирулентность, о чем свидетельствуют биологические пробы на морских свинках [8].

У экспериментальных морских свинок, которым интраперитонеально вводили в разовой дозе 100 000 000 бактерий, инкубированных при 37 °С в течение 18 часов в непереработанных препаратах липазы и/или эстеразы, выделенных из ЛБВМ, туберкулезный процесс существенно регрессировал, и в течение семи недель после инокуляции видимой патологии не отмечалось, тогда как контрольные животные умерли на седьмой неделе. Однако бактерицидную активность препараты не проявляли, и у опытных морских свинок на восьмой неделе после заражения наблюдалось начало туберкулезного процесса [9].

При изучении свойств экстракта из *G. mellonella* с целью выделения фактора, ответственного за противотуберкулезную активность, было установлено, что липолитические и антибактериальные свойства обеспечивает белковая составляющая экстракта, в том числе и липазы, способные разрушать отдельные жизненно важные для микобактерий липиды и другие видоспецифические молекулы липидного слоя клеточной стенки [10].

Таким образом, даже после непродолжительного воздействия препаратами ЛБВМ микобактерии становятся авирулентными и более уязвимыми.

В результате научных исследований, проводимых научными сотрудниками Восточно-Казахстанского государственного технического университета им. Д. Серикбаева (ВКГТУ, г. Усть-Каменогорск) в рамках отечественного гранта, в 2015–2017 гг. были разработаны новые биологически активные добавки (БАД) «Спиртовый бальзам» и «Медовый бальзам» на основе продуктов пчеловодства и ЛБВМ для профилактики и комплексного лечения туберкулеза. На препараты разработаны и утверждены стандарты предприятия, поданы заявки на изобретения.

В 2016 г. было проведено экспериментальное изучение *in vitro* противотуберкулезной активности БАД «Спиртовый бальзам» на основе продуктов пчеловодства, содержащего этиловый спирт не более 20 %, в сравнении и в сочетании с ПТП в отношении музейного штамма (H37RV) *Mycobacterium tuberculosis*. В результате исследований было установлено, что одновременное добавление в питательную среду к ПТП первого и второго рядов различных разведений «Спиртового бальзама» на основе продуктов пчеловодства усиливает их бактерицидное действие и в 100 % случаев в более ранние сроки подавляет рост лекарственно-чувствительных и устойчивых штаммов МБТ.

Следующим этапом доклинических исследований согласно методике стало изучение химиотерапевтической эффективности спиртового бальзама на модели экспериментальной туберкулезной инфекции.

Цель нашего исследования — определить эффективность лечения зараженных музейным штаммом микобактерии (H37RV) морских свинок спиртовым бальзамом на основе продуктов пчеловодства в сравнении и в комплексе с классическими противотуберкулезными препаратами.

Материалы и методика исследований

Эксперимент проводился в 2017 г. на базе референс-лаборатории Национального научного центра фтизиопульмонологии РК (г. Алматы) согласно методическим указаниям по изучению противотуберкулезной активности фармакологических веществ и изучению их химиотерапевтической эффективности в опытах *in vivo* [11]. Экспериментальное исследование было выполнено на 26 морских свинок весом 250–300 г, которые содержались в одинаковых условиях и однотипном пищевом рационе на протяжении всего эксперимента.

Для получения экспериментальной модели туберкулезного процесса животных заражали подкожным введением в правую паховую область 0,1 мг двухнедельного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37RV. Для этого двухнедельную культуру выбранных для заражения штаммов снимали с косяка плотной среды, затем готовили бактериальную суспензию по 5-му стандарту оптической плотности. Титр полученной суспензии — 5×10^6 микробных тел в 1 мл. Исходную суспензию разводили в 10 раз и получили титр — 5×10^7 микробных тел в 1 мл. К 4 мл полученной суспензии добавляли 1 мл физиологического раствора с целью получения суспензии титром 4×10^7 микробных тел в 1 мл. Согласно методике весь эксперимент подразделялся на контроль и опыт (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Схема опыта по изучению противотуберкулезной активности спиртового бальзама

Группа		Кол-во животных	Лечение
Контроль	1-я контрольная	8 (из них 2 для эвтаназии до лечения)	Без лечения
	2-я контрольная	6	Изониазид (H) в дозе 10 мкг/кг и рифампицин (R) в дозе 15 мг/кг
Опыт	1-я опытная	6	Изониазид в дозе 10 мкг/кг, рифампицин в дозе 15 мг/кг и бальзам по одной чайной ложке 3 раза в день
	2-я опытная	6	Бальзам по одной чайной ложке 3 раза в день

Лечение животных начинали после развития туберкулезного процесса, который оценивался по общему состоянию животных (снижение активности, затрудненное дыхание, снижение массы). Для установления факта получения модели туберкулезной инфекции через 24 дня проводили эвтаназию с помощью эфирного наркоза двух особей из первой контрольной группы зараженных животных.

У животных при вскрытии визуально обнаруживались очаги туберкулезного воспаления. Из гомогенатов паренхиматозных органов высевались *M. tuberculosis*. Гистологическое и микробиологическое исследования, подтвердившие развитие туберкулезного процесса в печени и в месте заражения, послужили основанием для начала лечения животных.

Эффективность лечения определяли по продолжительности жизни животных, разнице в массе тела животных в начале и конце опыта, наличию специфических изменений в паренхиматозных органах, индексу высеваемости, индексу поражения.

При расчете средней продолжительности жизни лабораторных животных учитывали срок гибели каждого животного в группе. После гибели всех животных или по окончании опыта среднюю продолжительность жизни в контрольной и опытной группах рассчитывали как среднеарифметическое значение по формуле (дней):

$$P_{cp} = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5 + n_6}{6}, \quad (1)$$

где n_1, n_2 и т.д. — продолжительность жизни каждой морской свинки в группе; 6 — количество морских свинок в группе.

Индекс высеваемости микобактерий туберкулеза определяли как среднее от общего количества колониеобразующих единиц на каждую группу. Кусочки внутренних органов каждого животного растирали в фарфоровой ступке, заливали 5 мл 6 %-ного раствора серной кислоты, гомогенизировали. Полученную массу центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин. Время контакта микобактерий туберкулеза с серной кислотой не превышало 15–20 мин. Серную кислоту сливали, осадок дважды отмывали 0,9 %-ным раствором NaCl и засеивали в 5 пробирок с плотной яичной средой Левенштейна-Йенсена. Пробирки с посевами инкубировали в термостате при 37 °С в течение 10–12 недель [11].

Интенсивность роста культуры учитывалась по четырехбалльной системе [11]:

- 1–3 колонии на 1 косяке с плотной яичной средой +/- (0);
- 4–10 колоний на 1 косяке с плотной яичной средой + (1);
- 11–30 колоний на 1 косяке с плотной яичной средой ++ (2);
- 31–100 колоний на 1 косяке с плотной яичной средой +++ (3);
- сплошной рост колонии на 1 косяке с плотной средой ++++ (4).

Макроскопическая оценка изменения внутренних органов для каждой группы животных определялась индексом поражения по четырехбалльной системе [11]:

- +/- (0) — 1–3 мелких очага в легких;
- + (1) — 4–10 мелких полупрозрачных очагов в легких при отсутствии видимой патологии в печени и селезенке;
- ++ (2) — 10–20 хорошо выраженных очагов в легочной ткани и единичные — в печени и селезенке;
- +++ (3) — 20 и более крупных очагов в легких (до 0,5 см в диаметре), множественные очаги в печени и селезенке;
- ++++ (4) — кавернозно-некротические поражения легких, кахексия, гибель животного.

Эффективность каждого режима химиотерапии выражалась в процентах индексом эффективности, исчисляющимся по формуле (2):

$$\text{Индекс эффективности} = 100 - \frac{\text{пор}_u}{\text{пор}_{к1}} \cdot 100, \quad (2)$$

где пор_u — индекс поражения исследуемой группы; $\text{пор}_{к1}$ — индекс поражения 1-й контрольной группы.

Обработку экспериментальных данных проводили методом вариационной статистики. Степень достоверности разности полученных данных определяли по критерию Стьюдента.

Результаты исследований

Проведенные наблюдения развития туберкулезного процесса в 1-й контрольной группе показали, что животные этой группы наиболее тяжело перенесли заражение. Хотя среди животных этой группы в ходе эксперимента не было отмечено гибели животных (средняя продолжительность жизни составила 75 дней), тем не менее у всех животных выявлялись все макроскопические и микроскопические признаки заболевания: вес животных снизился на 82,9±2,1 г (табл. 2), все животные были вялыми, их шерстка была тусклой. Они неохотно употребляли пищу. Образовался дефект кожи 3×5 мм, отмечен свищ с казеозом.

Т а б л и ц а 2

Результаты определения эффективности лечения экспериментального туберкулеза морских свинок

Группы животных, зараженных НЗ7RV		Смертность, %		Средняя продолжительность жизни, суток	Масса тела, г				Масса органов, г		
		Нач. опыта	Оконч. опыта		до	после	Разница		Легкие	Печень	Селезенка
							г	%			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Контроль	1-я контрольная без лечения	0	0	75±0	255,1 ±1,77	172,2 ±1,16	-82,9 ±2,1	-32,5	7,105 ±0,07	23,869 ±0,21	3,34 ±0,05
	2-я контрольная HR	0	0	75±0	285,8 ±1,82	274,4 ±1,66	-11,6 ±1,9*	-4,0	3,433 ±0,02*	14,763 ±0,12*	1,676 ±0,03*

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Опыт	1-я опытная HR+бальзам	0	50	59±7,0*°	255,7 ±1,68	304,1 ±1,95	+ 48,4 ±1,6*°	+18,9	3,483 ±0,02*	14,807 ±0,1*	1,243 ±0,02*°
	2-я опытная бальзам	0	83,3	61±11,1*°	299,1 ±1,71	217,1 ±1,46	-82,0 ±2,4°	-27,4	5,961 ±0,04*°	22,116 ±0,19*°	3,021 ±0,04*°

Примечание: * — достоверно к 1-й контрольной группе ($p < 0,05$); ° — достоверно ко 2-й контрольной группе ($p < 0,05$).

При вскрытии отмечалось полнокровие внутренних органов, на поверхности легких, печени и селезенки отмечались многочисленные серовато-желтые бугорки, местами сливающиеся друг с другом (рис. 1).

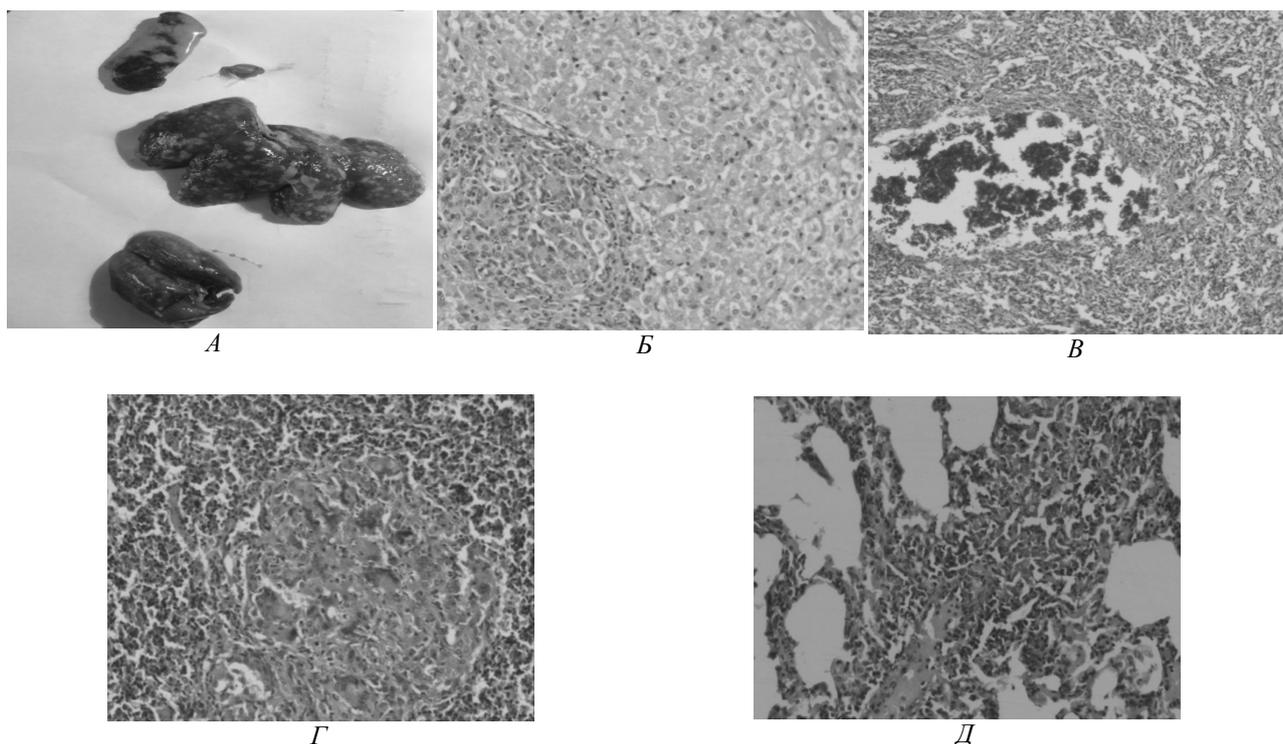


Рисунок 1. Макроскопическая картина внутренних органов (А) и гистологические срезы печени (Б), лимфоузла (В), селезенки (Г) и легкого (Д) морских свинок 1-й контрольной группы

Правые паховые лимфоузлы были значительно увеличены в размерах, на разрезе у них, как правило, выделялся сливкообразный гной. Средняя величина индекса пораженности внутренних органов составила 4+ (табл. 3).

Таблица 3

Показатели эффективности лечения морских свинок противотуберкулезными препаратами первого ряда в комплексе со спиртовым бальзамом

Группа	Индекс поражения	Эффективность режима химиотерапии (индекс эффективности), %
1-я контрольная — без лечения	++++	Без лечения
2-я контрольная — HR	0	100
1-я опытная — HR+бальзам	0	100
2-я опытная — бальзам	+++	25

При гистологическом исследовании внутренних органов у животных этой группы было исследовано 24 фрагмента (по 6 гистологических блоков из печени, легких, селезенки и лимфатического узла).

Патоморфология внутренних органов в 100 % случаев выявила наличие туберкулезных бугорков во внутренних органах с различной тканевой реакцией. В паренхиматозных органах было обнаружено специфическое воспаление с распадом и деструкцией ткани преимущественно в легких, печени и селезенке (рис. 1). Казеозно-некротические массы в данной группе были представлены центральным творожистым некрозом с ограниченными грануляциями, которые инфильтрированы лимфоцитами, эпителиоидными клетками и гигантскими многоядерными типа Лангханса, фибробластами, плазмócитами.

В некоторых очагах распад встречался и в толще волокон грануляционной ткани пахового лимфоузла с обеднением лимфоидной ткани и макрофагально-гистиоцитарными гранулемами. В легочной ткани наряду с туберкулезным воспалением пролиферативного типа имелись умеренные дисплетазы и интерстициальные утолщения альвеолярных перегородок.

Помимо гистологического было проведено микробиологическое подтверждение наличия туберкулезного процесса у морских свинок. Посев и микроскопия органов у животных этой группы показали обильный рост микобактерий туберкулеза (3+) из всех проб.

При оценке результатов лечения животных 2-й контрольной группы было обнаружено, что использование противотуберкулезных препаратов основного ряда (изониазида, рифампицина) привело к их полному излечению. Все зараженные животные дожили до конца эксперимента, средняя продолжительность их жизни составила 75 дней. Произошло снижение веса на $11,6 \pm 1,9$ г (4,0 %). Дефект кожи на месте заражения у животных закрылся к концу первого месяца с образованием рубца. При забое животных этой группы визуально не было обнаружено признаков поражения внутренних органов. Легкие, печень, селезенка были обычного размера.

На гистологическое исследование было взято по одному фрагменту с каждого органа у 6 животных, что составляет 24 парафиновых блока. Патогистология указывает на наличие туберкулезных очагов преимущественно в лимфоузле и селезенке в половине случаев (в 3 из 6 наблюдений в каждом органе). Туберкулезные гранулемы характеризовались различной тканевой реакцией, начиная от альтерации и заканчивая фазами пролиферации, и местами подвергаясь слиянию. Гигантоклеточная реакция представлена умеренно (1–2 в одном поле зрения). В 30 % случаев изменения носили неспецифический характер, что свидетельствует о действии противотуберкулезных препаратов на МБТ и рассасывании туберкулезных гранул.

В печени воспаление локализовалось преимущественно в перипортальных трактах и сопровождалось интенсивной гигантоклеточной реакцией с выраженной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией по периферии. Было зафиксировано 2 туберкулезных очага. В легочной ткани, как и в печени, 2 очага туберкулеза, интенсивной экссудации обнаружено не было, и воспаление носило преимущественно продуктивный тип. Альвеолы местами были ателектазированы, но в целом воздушность паренхимы сохранена.

Общее количество очагов туберкулеза составляет 10 из 24 фрагментов внутренних органов (41,7 %).

У животных 1-й опытной группы, в лечении которых использовали изониазид, рифампицин и спиртовой бальзам, были получены схожие результаты с группой, которых лечили только изониазидом и рифампицином. Из 6 экспериментальных животных этой группы до конца эксперимента пали трое (на 45, 47 и 50-е сутки). Средняя продолжительность жизни в этой группе составила $59 \pm 7,0$ суток. Несмотря на падеж животных, они были упитанными, вес увеличился на $48,4 \pm 1,6$ г, что существенно больше, чем в контрольных группах (табл. 2). При хороших результатах животные не доживали до конца эксперимента. Это объясняется неохотным приемом спиртового бальзама морскими свинками и возникновением у них жировой дистрофии гепатоцитов вследствие алкогольной интоксикации организма.

В данной группе всего было найдено 7 фокусов туберкулезного воспаления из 24 фрагментов внутренних органов (29,2 %), 2 очага в ткани печени, 1 участок в легком. Также выявлено по 2 фокуса в лимфоузле и селезенке, соответственно. В данной группе выражена пролиферативная тканевая реакция, которая характеризовалась отсутствием центрального творожистого некроза среди сливающихся эпителиоидно-макрофагальных гранул (рис. 2). Локализация воспаления была центрилобулярно в печени и в мозговом слое лимфоузле.

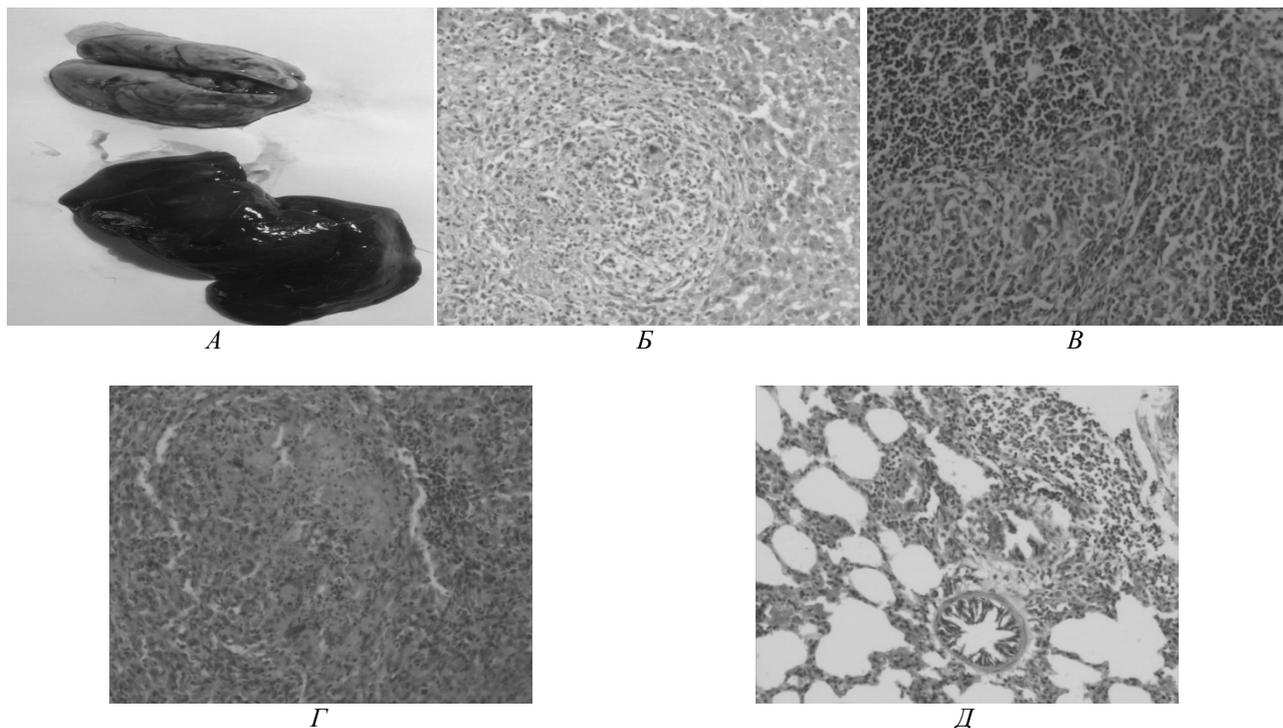


Рисунок 2. Макроскопическая картина паренхиматозных органов (А) и гистологические срезы печени (Б), лимфоузла (В), селезенки (Г) и легкого (Д) морских свинок 1-й опытной группы

В селезенке локализация наблюдалась преимущественно в мальпигиевых тельцах лимфатических узелков. В паренхиме легких гранулематозное воспаление охватывало перибронхиальные пространства и интерстиции без гигантоклеточно-многоядерной инфильтрации. Лимфоплазмочитарная локализация по периферии и очаговое полнокровие представлены умеренно.

Особый интерес представляли результаты лечения экспериментальных животных 2-й опытной группы, в лечении которых использовали только спиртовой бальзам. Из 6 морских свинок пали пятеро, до конца дожила только одна морская свинка. Средняя продолжительность жизни в этой группе составила $61 \pm 11,1$ день.

В данной группе у животных отмечались явные признаки заболевания: морские свинки были более вялыми, истощенными, их вес, как и в 1-й контрольной группе, значительно снизился, на $82 \pm 2,4$ г (27,4 %). На вскрытии у всех животных во внутренних органах обнаружены патологические изменения, на поверхности печени у трех морских свинок выявлялись единичные мелкие бугорки серовато-желтого цвета, без тенденции к слиянию, в легких были единичные мелкие очаги. У остальных трех животных в печени, селезенке и легких очаги поражения отмечались по всей поверхности органов. Индекс пораженности внутренних органов на 3+.

При морфологическом и гистологическом исследованиях данной группы обнаружены множество очагов туберкулезного воспаления во всех органах (100 %), выраженная гигантоклеточная тканевая реакция, альтеративный тип воспаления в виде гомогенных некротических масс. Для данной группы было характерно наличие параспецифических реакций, в частности, очаговая паренхиматозная дистрофия гепатоцитов и локальные дисателектазы легочных альвеол. В печени обнаружены признаки жировой дистрофии гепатоцитов.

В лимфоузле гранулемы локализовались в паракортикальной зоне, в ткани селезенки гранулема обнаружена в перисинусоидальном пространстве красной пульпы. В целом гистоархитектоника внутренних органов частично стерта вследствие наличия репаративных процессов и появления оформленной грануляционной ткани с полнокровием сосудов микроциркуляторного русла.

Выводы

Изучив показатели эффективности лечения и результаты микроскопии всех представленных выше групп животных, можно сделать заключение: основным критерием оценки эффективности противотуберкулезных препаратов является количество очагов туберкулезного воспаления, верифици-

руемых гистологически во внутренних органах экспериментальных животных, и наличие в тканях специфических для туберкулеза изменений.

Установлено, что в 1-й контрольной группе (без лечения) во всех 24-х фрагментах тканей изучаемых органов гистологически был обнаружен типичный туберкулез с различными фазами воспаления, протекавший по типу острой генерализованно-гематогенной диссеминации с очагами обсеменения по внутренним органам.

Доказано, что проведение монотерапии с использованием спиртового бальзама в лечении животных, больных туберкулезом с сохраненной чувствительностью, способствует сдерживанию размножения бактериальной популяции в организме, но не приводит к полному излечению.

Экспериментально доказано, что использование для лечения лабораторных животных спиртового бальзама в комплексе с противотуберкулезными препаратами основного ряда не останавливало туберкулезный процесс, но значительно ограничивало его развитие. Патоморфологические и гистологические исследования внутренних органов морских свинок, получавших лечение спиртовым бальзамом в комплексе с ПТП первого ряда, показали, что у них очагов туберкулезного воспаления на 12,5 % меньше, чем у экспериментальных животных, леченных только противотуберкулезными препаратами. Также в этой группе отмечено отсутствие гигантоклеточно-многоядерной инфильтрации в легких и центрального творожистого некроза в лимфоузлах и селезенке, наблюдались репарация и регенерация паренхимы и стромы исследованных органов.

Таким образом, в результате эксперимента доказана эффективность и целесообразность применения препаратов на основе продуктов пчеловодства в комплексной терапии туберкулеза человека. Во избежание нежелательных изменений и реакций организма в ходе лечения необходимо разработать и применять не содержащую спирт, удобную для хранения и применения лекарственную форму.

Список литературы

- 1 Global tuberculosis report 2016: WHO/HTM/TB/2016.13. Geneva: World Health Organization, 2016.
- 2 Тыщенко В.П. Физиология насекомых: учеб. пособие для студ. ун-тов, обуч. по спец. «Биология» / В.П. Тыщенко. — М.: Высш. шк., 1986. — 303 с.: ил.
- 3 Ульянич Н.В. Целебные личинки восковой моли / Н.В. Ульянич // Пчеловодство. — 2015. — № 8. — С. 56–57.
- 4 Loh J.M. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus / J.M. Loh, N. Adenwalla, S. Wiles, T. Profit // Virulence. — 2013. — Vol. 4. — P. 419–428.
- 5 Метальников С.И. Проблема туберкулеза. Новые пути в изучении туберкулеза / С.И. Метальников // Современные записки. — 1921. — Кн. III. — С. 239–248.
- 6 Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. — 5-е изд., испр. и доп. / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. — СПб.: СпецЛит, 2010. — 760 с.: ил.
- 7 Cardona P.J. Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis* / P.J. Cardona, C.Y. Soto, C. Martin, B. Giquel, G. Agustí, E. Guirado, T. Sirakova, P. Kolattukudy, E. Julian, M. Luquin // Microbes and Infection. — 2006. — Vol. 8, Iss. 11. — P. 183–190.
- 8 Mankiewicz E. The action of lipolytic enzymes of larvae of *Galleria melonella* on virulent *Mycobacterium tuberculosis* / E. Mankiewicz // Can. J. Med. Sci. — 1952. — Vol. 30, No. 1. — P. 106–112.
- 9 Анненков Г.А. О возможности применения природных липаз и эстераз для ингибирования *Mycobacterium tuberculosis* / Г.А. Анненков, Н.Н. Клепиков, Л.П. Мартынова, В.А. Пузанов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2004. — № 6. — С. 52–56.
- 10 Останина, Е.С. Технология переработки восковой моли, изучение противотуберкулезных свойств хитозана и взаимодействия с липолитическими ферментами: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Екатерина Сергеевна Останина. — Щёлково, 2007. — 142 с.: ил.
- 11 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — С. 571–579.

Н.В. Валитова, С.Ф. Колосова

***In vivo* тәжірибесінде бал арасы шаруашылығы өнімдерінің туберкулез ауруына қарсы белсенділігі**

Мақалада сезінгіш мұражайлық микробактерия штаммын (H37RV) жұқтырған теңіз шошқаборығының эксперименттік туберкулез ауруын емдеуде негізгі қатардағы классикалық туберкулезге қарсы дәрі-дәрмектермен салыстырғанда және жиынтығында бал арасы өнімдері негізінде дайындалған

спирттік бальзам әсерлілігін клиникаға дейін зерттеу қорытындылары келтірілген. Эксперимент *in vivo* тәжірибесінде фармакологиялық заттардың туберкулезге қарсы белсенділігін және химиотерапиялық әсерлілігін зерттеу бойынша әдістемелік нұсқауларға сәйкес Қазақстан Республикасы Ұлттық ғылыми фтизиопульмонология орталығында (Алматы қ.) референс-зертханасында жүргізілді. Анықталғаны — бір дәрілік ем әдісінде спирттік бальзамды пайдалану толық емделуде жеткізбейді, бірақ ағзадағы бактериялардың көбеюін тоқтатуға жағдай жасайды. Екі туберкулезге қарсы дәрі-дәрмекті (изониозид және рифампицин) және бал арасы өнімдері негізінде дайындалған спирттік бальзамды қатар пайдаланғанда, тәжірибе соңында малдың салмағы жоғарылады. Бірінші қатардағы туберкулезге қарсы дәрі-дәрмектермен қатар, жинақта спирттік бальзаммен ем қабылдаған теңіз шошқаборықтарының ішкі ағзасын патоморфологиялық және гистологиялық зерттеулер, тек туберкулезге қарсы дәрі-дәрмектермен емделген малдармен салыстырғанда, туберкулездік қабыну ошақтарының 30 % аз екендігін көрсетті. Сонымен қатар осы топта өкпедегі алып жасушалы көпядролы без және көкбауырдағы лимфа жүйесінде ірімшіктелген орталық жоқтығы, сондай ақ зерттелген органдардың стромасы және ұлпаның репарациясы және регенерациясы байқалған.

Кілт сөздер: туберкулез, микобактерия, *in vivo* тәжірибесі, туберкулезға қарсы дәрі-дәрмектер, бал арасы шаруашылығы өнімдері, химиотерапиялық әсерлік, *Galleria mellonella*, патоморфология, гистологиялық зерттеу, туберкулез қабынуының ошағы.

N.V. Valitova, S.F. Kolosova

Anti-tuberculosis activity of beekeeping products *in vivo* experiment

This article provides the results of preclinical studies of the alcohol bitter efficacy based on bee products in comparison and in combination with classical main series anti-tuberculosis medication in the treatment of experimental tuberculosis of guinea pigs infected with a sensitive museum strain of mycobacterium (H37RV). The experiment was carried out on the basis of the Phthisiopulmonology National Scientific Center of the Republic of Kazakhstan's (Almaty) reference laboratory, according to the methodological guidelines for studying the antiphthisic activity of pharmacological substances and the study of their chemotherapeutic efficacy in the *in vivo* experiments. It has been established that the use of alcohol bitter in monotherapy does not lead to complete cure, but it helps to suppress the reproduction of the bacterial population in the body. The simultaneous use of two anti-tuberculosis medications (isoniazid and rifampicin) and an alcohol bitter based on bee products, the body weight of the animals has increased by the end of the experiment. The pathomorphological and histological studies of guinea pigs' the internal organs treated with alcohol bitter in combination with the first series anti-tuberculosis medication showed that they have 30 % less tuberculosis inflammation than animals which were treated only with antiphthisic medication. Also it was noted that there wasn't any giant-cell multinucleate infiltration in the lungs and central caseous necrosis in the lymph nodes and spleen, the parenchyma and stroma reparation and regeneration of the examined organs were observed in this group.

Keywords: tuberculosis, mycobacteria, *in vivo* experiment, anti-tuberculosis medication, beekeeping products, chemotherapeutic efficacy, *Galleria mellonella*, pathomorphology, histological studies, the focus of phthisic inflammation.

References

- 1 Global tuberculosis report 2016 (2016). WHO/HTM/TB/2016.13. Geneva: World Health Organization.
- 2 Tyshchenko, V.P. (1986). *Fiziologhiia nasekomykh [Physiology of insects]*. Moscow: Vysshiaia shkola [in Russian].
- 3 Ulianich, N.V. (2015). Tselebnye lichinki voskovoi moli [Healing wax larvae]. *Pchelovodstvo — Beekeeping*, 2, 56–57 [in Russian].
- 4 Loh, J. M., Adenwalla, N., Wiles, S., & Proft, T. (2013). *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*, 4(5), 419–428.
- 5 Metalnikov, S.I. (1921). Problema tuberkuleza. Novye puti v izuchenii tuberkuleza [Tuberculosis as a problem. New ways in tuberculosis studying]. *Sovremennye zapiski — Modern Notes*, III, 239–248.
- 6 Korotyayev, A.I. (2010). *Meditsinskaiia mikrobiologhiia, immunologhiia i virusologhiia [Medical microbiology, immunology and virology]*. — Saint Petersburg: SpetsLit [in Russian].
- 7 Cardona, P.J., Soto, C.Y., Martin, C., Giquel, B., Agusti, G., & Guirado, E., et al. (2006). Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in Mycobacterium tuberculosis. *Microbes and Infection*, 8(11), 183–190.
- 8 Mankiewicz, E. (1952). The action of lipolytic enzymes of larvae of *Galleria melonella* on virulent Mycobacterium tuberculosis. *Can. J. Med. Sci.*, 30, 106–112.
- 9 Annenkov, G.A., Klepikov N.N., Martynova, L.P., Puzanov, V.A. (2004). O vozmozhnosti primeneniia prirodnnykh lipaz i esteraz dlia inhibirovaniia Mycobacterium tuberculosis [Wide range of the use of natural lipases and esterases to inhibit Mycobacterium tuberculosis]. *Problemy tuberkuleza i bolezni lehkikh — Problems of tuberculosis and illness diseases*, 6, 52–56.

10 Ostanina, E.S. (2007). Tekhnolohiia pererabotki voskovoï moli, izuchenie protivotuberkuleznykh svoystv hitozana i vzaimodeistviia s lipoliticheskimi fermentami [Technology of *Galleria mellonella* processing, antituberculous properties of chitosan and interaction with lipolytic enzymes studying]. *Candidate's thesis*. Shchelkovo [in Russian].

11 Khabriev, R.U. (Eds.) (2005). *Rukovodstvo po eksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniiu novykh farmakologicheskikh veshchestv* [Experimental (preclinical) study of new pharmacological substances guideline]. Moscow: Meditsina [in Russian].