© Коллектив авторов, 2020

Авоян Г.Э.¹, Кулага О.С.¹, Николаева И.А.¹, Андреев И.В.¹,
Топтыгин А.Ю.¹, Черченко Н.Г.¹, Санков М.Н.¹, Мартынов А.И.¹,
Гегечкори В.И.^{2,3}, Салтыкова О.В.², Смирнов В.В.^{1,2}

Стандартизация пчелиного яда как сырья для производства лекарственных средств для иммунотерапии, в том числе аллергена и аллергоида из пчелиного яда

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. В фармацевтической промышленности продукты пчеловодства широко используются для получения лекарственных препаратов. Пчелиный яд – третий по медицинской значимости продукт пчеловодства. Из него производят препараты, которые применяют наружно, в инъекциях или принимают внутрь. При производстве лекарственных препаратов, содержащих пчелиный яд, важно учитывать дозу и возможную индивидуальную реакцию организма человека. Химический состав яда-сырца пчелиного очень сложен. На сегодняшний момент для стандартизации пчелиного яда как исходного сырья для фармацевтических препаратов нет современной нормативной документации. В связи с этим контроль качества и стандартизация субстанции пчелиного яда, предназначенной для производства лекарственных средств, представляют собой актуальную проблему.

Цель исследования – изучение физико-химических характеристик пчелиного яда-сырца различных серий для оценки и стандартизации его качества.

Материал и методы. Были изучены 5 серий яда-сырца пчелиного одного и того же производителя. Анализ проводили на основании ГОСТ 30426-97 и разработанной нами методики очистки и стандартизации яда-сырца очищенного. Использовали хроматографию, гель-фильтрацию, электрофорез в полиакриламидном геле.

Результаты. По данным исследований яда-сырца пчелиного, 4 серии из 5 не удовлетворяли требованиям стандарта ГОСТ 30426-97 по следующим показателям: массовая доля нерастворимых в воде примесей составляла 6,01 %, массовая доля воды – 9,17 %, время гемолиза – 300 с, массовая доля мелиттина – 35 % и апамина – 0,6 %, активность фосфолипазы A2 в 1 мг яда в пересчете на сухой вес – 94,01 МЕ. Были предложены методы очистки и стандартизации препаратов яда-сырца пчелиного.

Заключение. В проведенном исследовании нами был доказан низкий уровень стандартизации яда-сырца. Отсутствие утвержденной нормативной документации приводит к тому, что разные фармацевтические фирмы используют разные методы оценки качества сырья и методики его очистки, что, в свою очередь, влияет на качество готовой фармацевтической продукции. Для стандартизации сырья, из которого получают фармацевтические препараты, необходима разработка общей фармакопейной статьи (ОФС) «Яд-сырец пчелиный».

Ключевые слова: пчелиный яд; стандартизация; фармакопея; аллерген; аллергоид; мелиттин; апамин

Статья поступила 15.09.2020. Принята в печать 16.12.2020.

Для цитирования: Авоян Г.Э., Кулага О.С., Николаева И.А., Андреев И.В., Топтыгин А.Ю., Черченко Н.Г., Санков М.Н., Мартынов А.И., Гегечкори В.И., Салтыкова О.В., Смирнов В.В. Стандартизация пчелиного яда как сырья для производства лекарственных средств для иммунотерапии, в том числе аллергена и аллергоида из пчелиного яда. Иммунология. 2021; 42 (1): 60–67. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-1-60-67>

Для корреспонденции
Смирнов Валерий Валерьевич –
кандидат фармацевтических наук,
заведующий лабораторией
клинической фармакологии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: vall@mail.mipt.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

Финансирование. Исследование проводили в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Фарма-2020), Государственный контракт от 27.11.17 № 14.N08.11.0206 «Доклинические исследования лекарственного средства, действующего на аллерген-распознающий рецептор, для лечения аллергии к пчелиному яду».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Avoyan G.E.¹, Kulaga O.S.¹, Nikolaeva I.A.¹, Andreev I.V.¹,
Toptygin A.J.¹, Cherchenko N.G.¹, Sankov M.N.¹, Martynov A.I.¹,
Gegechkori V.I.^{2,3}, Saltykova O.V.², Smirnov V.V.^{1,2}

Standardization of bee venom as a raw material for the production of medicines for immunotherapy, including allergen and allergoid from bee venom

¹ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

³ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Pharmaceutical industry widely uses beekeeping products to obtain medicines. Among beekeeping products for medical use, bee venom represents number three on its importance. Pharmaceuticals based on bee venom are used externally, or as injections, or for oral administration. In the production of medicines containing bee venom, it is important to take into account the dose and possible individual response of the human body. The chemical composition of raw bee venom is very complex. Currently, there is no modern normative documentation for standardization of bee venom as a raw material for pharmaceutical preparations. Hence, quality control and standardization of the substance of bee venom intended for the production of medicines represent the urgent need.

Aim of research is to study the physicochemical characteristics of raw bee venom of various batches in order to evaluate and standardize its quality.

Material and methods. We have studied 5 batches of raw bee venom from the same manufacturer. The analysis was carried out on the basis of GOST 30426-97 Methods of purification and standardization of purified bee venom were developed in this study. Those included gel chromatography and PAAG electrophoresis.

Results. According to the results of studies of raw bee venom, 4 batches of 5 did not correspond the requirements of the GOST 30426-97 in terms of mass fraction of water-insoluble impurities (6.01 %); mass fraction of water (9.17 %); hemolysis time (300 s), mass fraction of melittin and apamin (35 %; 0.6 %), respectively. Methods for the purification and standardization of preparations from raw bee venom were suggested.

Conclusion. In our study, we have proven the low level of the standardization of raw poison. The lack of approved normative documents leads to the fact that different pharmaceutical companies use different methods for evaluating the quality of raw materials and methods for their purification, which, in turn, affects the quality of final pharmaceutical products. Therefore the part of General Pharmacopoeia «Raw Bee Poison» (related to standardization of raw materials from which pharmaceuticals are being obtained) should be developed.

Keywords: bee venom; standardization; Pharmacopoeia; allergen; allergoid; melittin; apamin

Received 15.09.2020. Accepted 16.12.2020.

For citation: Avoyan G.E., Kulaga O.S., Nikolaeva I.A., Andreev I.V., Toptygin A.J., Cherchenko N.G., Sankov M.N., Martynov A.I., Gegechkori V.I., Saltykova O.V., Smirnov V.V. Standardization of bee venom as a raw material for the production of medicines for immunotherapy, including allergen and allergoid from bee venom. *Immunologiya*. 2021; 42 (1): 60–7. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-1-60-67> (in Russian)

Funding. The study was carried out within the framework of the Federal Program «PHARMA-2020», on the topic «Preclinical studies of the remedy for the treatment of bee venom allergy acting on the allergen recognizing receptor», Contract of 27.11.17 No 14.N08.11.0206.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence
Valery V. Smirnov – PhD,
Head of Laboratory
of Clinical Pharmacology
of NRC Institute of Immunology
FMBA of Russia,
Moscow, Russian Federation
E-mail: vall@mail.mipt.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

Введение

В современной медицине продукты пчеловодства широко используются для получения лекарственных препаратов в фармацевтической промышленности [1]. В последнее десятилетие наблюдается повышение интереса к продуктам пчеловодства [2, 3]. Пчелиный яд является третьим по медицинской значимости продуктом пчеловодства [4]. Терапевтические свойства яда-сырца пчелиного позволяют использовать его при заболеваниях нервной и сердечно-сосудистой системы, при лечении мигрени, радикулитов, ревматизма, гипертонии. В связи с этим необходимо обеспечить стандартизацию яда-сырца и его соответствие нормативной документации.

Яд пчелы – бесцветная, жгучая и очень горькая жидкость со своеобразным запахом, которая быстро высыхает на воздухе. Яд растворим в воде, растительных маслах. Содержание сухого вещества составляет около 45 % [5], реакция водного раствора яда является кислой (рН 4,5–5,5). Пчелиный яд тяжелее воды, его относительная плотность – 1,08–1,13 г/см³. Яд устойчив при замораживании, но разрушается под действием окислителей, этилового спирта, концентрированных щелочей, кислот, а также под влиянием солнечного света.

Химический состав яда-сырца пчелиного очень сложен. В него входят различные органические соединения, полипептиды, эфирные масла, аминокислоты, кислоты – соляная, муравьиная, ортофосфорная, а также микроэлементы, ферменты гиалуронидаза и фосфолипаза А [6]. Названные ферменты вызывают у людей аллергию на яд пчел. Фермент фосфолипаза А действует на молекулы фосфолипидов (лецитинов), при этом образуется токсичное вещество – лизолецитин, который повреждает мембраны клеток, вызывает гемолиз. Фосфолипаза А ускоряет реакции отщепления остатка жирной кислоты. Фермент гиалуронидаза увеличивает проницаемость клеток кровеносных капилляров. Помимо ферментов, при разделении пчелиного яда на фракции в одной из них обнаруживают полипептиды мелиттин и апамин, которые вызывают гемолиз, сокращение гладких мышц, блокируют передачу нервного возбуждения. Например, апамин ингибирует SK-каналы, что увеличивает возбудимость нейронов и снижает пороговое значение для генерирования потенциала действия [7]. Важным компонентом пчелиного яда является MCD-пептид (Mast cell degranulating пептид – пептид, дегранулирующий тучные клетки), который увеличивает проницаемость капилляров и вызывает дегрануляцию тучных клеток. Также в состав яда входит адолапин, который обладает противовоспалительными и болеутоляющими свойствами.

Терапевтическое действие пчелиного яда основывается на комплексном воздействии всех входящих в состав компонентов. Яд влияет на выработку противовоспалительных гормонов, активизирует работу надпочечников и всех жизненно важных органов, влияет на иммунную систему [8]. Считается, что самый эф-

фективный метод лечения – это введение свежего яда, поэтому наиболее распространенный и действенный способ – ужаление пчелами. Недостатками этого метода являются круглогодичная необходимость в пчелах, болезненность и возможная аллергическая реакция. Поэтому перед его применением необходимо провести пробу на аллергию. Самой большой проблемой является невозможность стандартизации подобного метода лечения, что выводит данный способ из области доказательной медицины.

Обычно при испытании яда-сырца пчелиного применяют ГОСТ 30426-97. Этот стандарт был принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации Содружества Независимых Государств в 1997 г. после распада СССР. На территории Евразийского экономического союза межгосударственные стандарты применяются добровольно. В настоящее время требования ГОСТ 30426-97 не отвечают запросам фармацевтической отрасли. Таким образом, современная нормативная документация для стандартизации пчелиного яда как исходного сырья для фармацевтических препаратов отсутствует, и необходима разработка общей фармакопейной статьи (ОФС) «Яд-сырец пчелиный», которая будет способствовать должному контролю качества и стандартизации субстанции пчелиного яда, предназначенной для производства лекарственных средств.

Материал и методы

Объект исследования. 5 серий яда-сырца пчелиного одного производителя («Апис», Россия), полученные в разные сезоны.

Оцениваемые показатели. Испытания проводили согласно ГОСТ 30426-97 [9]. Показатель «Внешний вид» (порошок в виде мелких крупинок и чешуек; цвет белый с кремоватым оттенком или желтизной; консистенция порошкообразная) определяли визуально при естественном дневном освещении. Другие показатели («Нерастворимые примеси»; «Массовая доля сырой золь»; «Активность фосфолипазы А2»; «Активность глюкозамингликангидролазного комплекса (ГАГГ)»; «Время гемолиза»; «Массовая доля мелиттина» и «Массовая доля апамина») определяли инструментальными методами, согласно межгосударственному стандарту ГОСТ 30426-97 [9], где приведены подробные методики.

В связи с тем что в образцах яда-сырца при растворении отмечено выпадение осадка, для его очистки нами был предложен метод гель-хроматографии на колонке с Superdex-75, 50×90 (Pharmacia Biotech, США) с предварительной фильтрацией на колонке с Sephadex-G25 (Pharmacia Biotech, США).

Для оценки и дальнейшей стандартизации очищенных образцов выполняли аналитическую хроматографию на откалиброванной коммерческой колонке Superdex-75, 10×30 (Pharmacia Biotech, США) и электрофорез в полиакриламидном геле по Лэмбли [10].

Результаты испытания 5 серий яда-сырца одного производителя по ГОСТ 30426-97

Определяемый показатель	Номер серии					Норма
	1	2	3	4	5	
Массовая доля нерастворимых в воде примесей, %	6,01	3,08	4,34	4,67	3,56	< 5
Массовая доля воды, %	6,30	5,27	9,17	7,89	8,00	< 8
Массовая доля сырой золы, %	2,00	1,65	1,20	0,54		< 2
Активность фосфолипазы А2 в 1 мг яда в пересчете на сухой вес, МЕ	105,00	115	205,06	108,01	94,01	> 100
Активность глюкозамингликангидролазного комплекса в 1 мг, в пересчете на сухой вес, мМЕ	105,10	250,09	306,78	350,50	400,24	> 90
Определение времени гемолиза, с	300	256	205	196	278	< 300
Массовая доля мелиттина, %	55	35	89	60	76	> 50
Массовая доля апамина, %	2,8	0,6	5,6	3,0	3,5	> 2

Примечание. Отклонения от ГОСТ 30426-97 выделены полужирным шрифтом.

Результаты

Все 5 серий яда-сырца одного производителя удовлетворяли требованиям ГОСТ 30426-97 по следующим показателям: «Внешний вид», «Цвет» и «Консистенция». Серии оценивали также по другим показателям в соответствии с ГОСТом, а именно: «Массовая доля нерастворимых в воде примесей, %»; «Массовая доля воды, %»; «Массовая доля сырой золы, %»; «Активность фосфолипазы А2 в 1 мг яда в пересчете на сухой вес в международных единицах (МЕ)»; «Активность глюкозамингликангидролазного комплекса (ГАГГ) в 1 мг в пересчете на сухой вес, мМЕ»; «Время гемолиза, с»; «Массовая доля мелиттина, %»; «Массовая доля апамина, %». Результаты анализа приведены в таблице. Как видно из приведенных данных, не все серии удовлетворяют требованиям ГОСТ 30426-97.

Еще одним важным наблюдением являлось отмеченное в образцах яда-сырца выпадение осадка при растворении и появление воскового налета на стенках сосуда. Вероятно, это вызвано экстракцией в раствор веществ из посторонних примесей яда-сырца, поскольку способ получения яда даже внутри улья не гарантирует отсутствия загрязнения конечного продукта пыльцой, пергой, воском. В связи с этим для дальнейшего использования было необходимо провести дополнительную очистку яда-сырца.

Одним из основных направлений применения пчелиного яда-сырца является производство аллергена и аллергоида. При аттестации для этих целей требования ГОСТ 30426-97 к стандартизации недостаточны. В частности, необходимо оценивать белковый и пептидный профиль яда-сырца. Для разработки требований к оценке белкового и пептидного профиля была выбрана одна из изученных серий яда-сырца, с которой проводились все последующие манипуляции.

Для очистки яда-сырца выбрали метод гель-хроматографии. 30 г яда-сырца пчелиного растворяли в 3000 мл дистиллированной воды до конечной концентрации 10 мг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при периодическом перемешивании. Полученный экстракт центрифугировали при

15 000 g и фильтровали надосадою через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Яд-сырец содержит заметное количество пигментов (возможно, растительного происхождения, из-за содержащихся в нем примесей пыльцы). Пигменты сорбируются на используемом для очистки геле Superdex-75, загрязняя основную разделяющую колонку. Для предотвращения такого загрязнения профильтрованный яд-сырец предварительно пропускали через колонку, сорбирующую пигменты, заполненную Sephadex-G25 (США), из расчета 10 мл матрицы на каждые 100 мл экстракта. Не связавшийся с Sephadex-G25 материал собирали под визуальным контролем и лиофильно высушивали. Далее материал очищали на колонке с Superdex-75, 50×90, собирали, высушивали и анализировали с помощью аналитической хроматографии на откалиброванной коммерческой колонке Superdex-75, 10×30 (Pharmacia Biotech, США) и электрофореза в полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях по Лэмбли [10].

На рис. 1 представлен препарат до и после очистки. Как видно из рис. 1, после очистки даже внешний вид яда-сырца значительно изменялся.

Аналитическую хроматографию проводили с помощью гель-фильтрации на откалиброванной коммерческой колонке Superdex-75, 10×30 (Pharmacia Biotech, США). Для этого образец очищенного гель-фильтрацией препарата яда-сырца в количестве 0,2 мл в концентрации 11,0 мг/мл наносили на колонку. Результаты аналитической хроматографии представлены на рис. 2.

На хроматограмме видны небольшой пик № 1 в диапазоне 39–43 кДа, что соответствует гиалуронидазе

Рис. 1. Яд-сырец до очистки (слева) и после очистки (справа)

Рис. 2. Профиль гель-фильтрации пчелиного яда-сырца при аналитической хроматографии на Superdex-75, 10×30. Пчелиный яд-сырец, 0,2 мл; PBS, 0,5 мл/мин 1,0 л/см 1,0 OUFs

По оси абсцисс – проток буферного раствора, мл; по оси ординат – УФ-поглощение при 280 нм (A_{280}). Вверху хроматограммы указаны положение маркеров и их молекулярная масса. Пик № 1 – гиалуронидаза и кислая фосфатаза; пик № 2 – фосфолипаза; пик № 3 – низкомолекулярные белки, основным из которых является мелиттин.

и кислой фосфатазе, выраженный пик № 2, соответствующий фосфолипазе (16 кДа). Как и следовало ожидать, наибольший пик располагается между 1,4 и 6,5 кДа, где ожидалось присутствие мелиттина (3 кДа), составляющего до 50 % сухого вещества пчелиного яда. Такой вид хроматограммы может быть рекомендован в качестве эталонного при очистке пчелиного яда-сырца.

Наряду с аналитической хроматографией в качестве еще одного метода стандартизации был предложен электрофорез по Лэмбли в 15 % полиакриламидном геле

Рис. 3. Типичный результат исследования очищенного препарата яда-сырца с помощью электрофореза в диссоциирующих условиях

1 – маркеры молекулярной массы; 2 – яд-сырец

в диссоциирующих условиях [10]. Типичная электрофореграмма приведена на рис. 3. В соответствии с целями нашего исследования основным компонентом, по которому следует стандартизовать яд-сырец и из которого планируется получать аллерген и аллергоид, является фосфолипаза, так как именно она отвечает за аллергизирующие свойства яда. Что касается мелиттина, он движется вместе с фронтом.

Такой профиль также может быть рекомендован в качестве эталонного при очистке пчелиного яда-сырца.

Обсуждение

Существует несколько способов получения пчелиного яда [4, 11], различающиеся выходом и чистотой/уровнем загрязнения продукта. Результаты нашего исследования яда-сырца пчелиного показали, что 4 из 5 серий не удовлетворяли требованиям ГОСТ 30426-97 по следующим показателям: «Массовая доля нерастворимых в воде примесей» (6,01 %), «Массовая доля воды» (9,17 %), «Время гемолиза» (300 с), «Массовая доля мелиттина» (35 %), «Массовая доля апамина» (0,6 %), «Активность фосфолипазы A2 в 1 мг яда в пересчете на сухой вес» (94,01 МЕ). Возможно, различия в качестве серий яда-сырца связаны с различными метеоусловиями или условиями сбора пчелиного яда.

Следует отметить, что в производстве лекарственных препаратов, содержащих пчелиный яд, важно учитывать его дозу и возможную индивидуальную реакцию организма человека. В современной фармацевтической промышленности изготавливают препараты, которые применяют наружно, в качестве инъекций и для приема внутрь. Пчелиный яд является биологически и фармакологически активным веществом с широким спектром действия. Активность выражается в единицах действия (ЕД).

В современной медицине широко применяются такие препараты, как «Апитоксин», «Вирапин», «Апизатрон», «Унгавивен», «Апифор». Например, «Апитоксин» представляет собой водный раствор для инъекций в ампулах, содержащий пчелиный яд. Препарат применяется для электрофореза, снимает болевой синдром, активен в отношении заболеваний сосудов, нервных воспалений. «Вирапин» – мазь в тубиках с высоким содержанием яда пчелиного лиофилизированного (0,15 мг на 1 г мази). Препарат обладает противовоспалительным, обезболивающим эффектами. Мазями являются «Апизатрон» и «Унгавивен» [12]. В фармацевтической промышленности пчелиный яд применяют также для производства других лекарственных форм: порошки, таблетки. Таблетки «Апифор» используют при электрофорезе, для лечения миозитов, полиартритов, заболеваний периферических сосудов.

Сегодня важной проблемой является рост числа людей, страдающих аллергией к перепончатокрылым, в частности к медоносной пчеле [13]. Основной метод лечения аллергии на ужаление пчел – иммунотерапия

пчелиным ядом. Основное ограничение этого метода – высокий процент аллергических побочных эффектов и их продолжительность. Возможным способом преодоления этого ограничения является использование для иммунотерапии аллергоидов. Именно это направление – разработка препаратов для иммунотерапии на основе аллергоидов (химически модифицированных аллергенов) – является областью наших научных интересов.

Полученные таким образом соединения характеризуются низкой аллергенной активностью при сохранении хороших иммунизирующих свойств, обеспечивающих продукцию специфических блокирующих антител. У пациентов с аллергическими реакциями IgE-ответ преимущественно направлен на определенные гликопротеины. Фосфолипаза А2 является наиболее значительным аллергеном с клинической точки зрения, поскольку она распознается сывороточным IgE почти у всех индивидуумов с аллергическими реакциями. Другие аллергены, менее важные, чем фосфолипаза, – гиалуронидаза и кислая фосфатаза. Эти компоненты находятся в диапазоне молекулярной массы 60–160 кДа. Высокомолекулярные протеины пчелиного яда практически не способны связываться с IgE и, следовательно, считаются клинически менее релевантными или даже полностью нерелевантными. Низкомолекулярные компоненты необходимо удалить в связи с их токсическими свойствами. Для достижения этих целей нам представляется оптимальным использование гель-фильтрации на носителе Superdex-75, диапазон фракционирования которого составляет 3–70 кДа. Для фармацевтических производителей, которые используют в своих препаратах другие компоненты яда-сырца пчелиного, условия очистки яда-сырца могут быть другими.

Все препараты, содержащие пчелиный яд, необходимо применять с особой осторожностью из-за высокой активности и токсичности, а также вероятности возникновения аллергических реакций. В связи с этим отсутствие нормативной документации для стандартизации яда-сырца для фармацевтического использования является большой проблемой.

В фармакопейной статье (ФС 42-2683-89) описан экспресс-анализ подлинности специфических белковых и пептидных компонентов яда-сырца, в основе которого лежит гемолиз эритроцитов крови лабораторных животных. Однако указанный метод не является достаточно специфичным, поскольку гемолиз может быть вызван широким кругом веществ как биологического, так и небиологического (тяжелые металлы) происхождения. Для повышения чувствительности и специфичности контроля качества учеными В.Д. Чивановым, В.И. Еременко, Р.А. Зубаревым, А.Н. Кнышом была разработана методика масс-спектрометрического анализа основных специфических белковых пептидных соединений – мелиттина и апамина, однако из-за сложности и дороговизны лабораторного оборудования она не вошла в рутинный анализ [14]. Следует особо отметить,

что указанная отечественная фармакопейная статья ФС 42-2683-89 утратила силу с 25 апреля 2001 г., но так и не получила замены в действующей Государственной фармакопее.

Разработанный нами способ очистки позволяет справиться с несоответствием серии таким показателям, как «Массовая доля нерастворимых в воде примесей» и «Массовая доля воды» для решения конкретной цели, а именно создания аллергена и аллергоида из пчелиного яда. Предлагаемые нами способы очистки успешно использованы при исследовании и стандартизации аллергенов березы бородавчатой, выделенных из пыльцы, собранной в период с 2008 по 2015 г. [15].

Заключение

Для стандартизации продукта животного или растительного происхождения необходима стандартизация на каждом этапе производства, начиная с методики сбора материала. Очевидно, что различные методики сбора яда-сырца могут влиять на его качество. Следует отметить, что вследствие сложного состава пчелиного яда для его стандартизации необходимо совместно использовать несколько инструментальных методов анализа. В проведенном исследовании мы показали низкий уровень стандартизации яда-сырца, используемого на российском фармацевтическом рынке для производства фармацевтических и косметических продуктов. По результатам исследований яда-сырца пчелиного 4 серии из 5 не удовлетворяли требованиям ГОСТ 30426-97 по следующим показателям: «Массовая доля нерастворимых в воде примесей», «Массовая доля воды», «Время гемолиза», «Массовая доля мелиттина», «Массовая доля апамина», «Активность фосфолипазы А2 в 1 мг яда в пересчете на сухой вес».

В настоящее время существует только один нормативный документ на сырье-яд пчелиный: ныне отмененный ГОСТ 30426-97. Данный стандарт не может обеспечить надлежащее качество яда-сырца. Отсутствие утвержденной нормативной документации для фармацевтического использования яда-сырца приводит к тому, что разные фармацевтические фирмы используют различные методы оценки качества сырья и методики его очистки, что, в свою очередь, влияет на качество готовой фармацевтической продукции. Вышесказанное наглядно свидетельствует о необходимости разработки ОФС «Яд-сырец пчелиный» для стандартизации субстанции пчелиного яда, предназначенной для производства лекарственных средств.

Вклад авторов

Отработка методик стандартизации – Гегечкори В.И., Салтыкова О.В., Смирнов В.В., методики очистки – Кулага О.С., Авоян Г.Э., Топтыгин А.Ю., Андреев И.В., Черченко Н.Г., дизайн экспериментов – Санков М.Н., Мартынов А.И., анализ результатов, написание текста, ответственность за целостность всех частей статьи – Смирнов В.В., редактирование, утверждение окончательного варианта статьи – Николаева И.А.

■ Литература

1. Trumbeckaite S., Dauksiene J., Bernatoniene J., Janulis V. Knowledge, attitudes, and usage of apitherapy for disease prevention and treatment among undergraduate pharmacy students in Lithuania. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015; 2015: 172502. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/172502>
2. Walsh E.G., Maher S., Devocelle M., O'Brien P.J., Baird A.W., Brayden D.J. High content analysis to determine cytotoxicity of the antimicrobial peptide, melittin and selected structural analogs. *Peptides*. 2011; 32 (8): 1764–73. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.006
3. Lee W.R., Kim K.H., An H.J., Kim J.Y., Han S.M., Lee K.G., Park K.K. Protective effect of melittin against inflammation and apoptosis on *Propionibacterium acnes*-induced human THP-1 monocytic cell. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; 740: 218–26. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.058
4. Реуцкий И.А. Лечение медом и другими продуктами пчеловодства. Рекомендации для врачей и пациентов. Москва : Эксмо, 2007: 448 с.
5. Mahmoud Abdu Al-Samie Mohamed Ali. Studies on bee venom and its medical uses. *Int. J. Adv. Res. Technol.* 2012; 1 (2): 69–83.
6. Lee G., Bae H. Bee venom phospholipase a2: yesterday's enemy becomes today's friend. *Toxins (Basel)*. 2016; 8 (2): 48.
7. Fletcher D.I., Ganellin C.R., Piergentili A., Dunn P.M., Jenkinson D.H. Synthesis and pharmacological testing of polyaminoquinolines

as blockers of the apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channel (SK(Ca)). *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15 (16): 5457–79.

8. Гуральник Ю.Ф. Апитерапия. Пчела источник молодости здоровья и жизни. Москва : Феникс, 2006.
9. ГОСТ 30426-97. Яд-сырец пчелиный. Технические условия. Минск, 1997: 14 с.
10. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование : практическое пособие. Москва : Наука, 1981: 288 с.
11. Черевко Ю.А., Бойценюк Л.И., Верещака И.Ю. Пчеловодство. Москва : КолосС, 2008: 384 с.
12. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. Москва : Новая волна, 2014: 1216 с.
13. Федосеева В.Н., Камышева В.А., Федоскова Т.Г., Хаитов Р.М., Некрасова О.В. Тропомозин и перекрестно-аллергические реакции у больных с инсектной аллергией. *Иммунология*. 2006; 27 (3): 189–91.
14. Чиванов В.Д., Еременко В.И., Зубарев Р.А., Кныш А.Н. Экспресс-анализ пчелиного яда. Пчеловодство. 1993; (9): 46–7.
15. Николаева И.А., Кулага О.С., Авоян Г.Э., Смирнов В.В., Топтыгин А.Ю., Павленко М.К. и др. Изучение аллергенов березы бородавчатой, выделенных из пыльцы, собранной в период с 2008 по 2015 г. *Иммунология*. 2019; 40 (6): 50–6. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16007

■ References

1. Trumbeckaite S., Dauksiene J., Bernatoniene J., Janulis V. Knowledge, attitudes, and usage of apitherapy for disease prevention and treatment among undergraduate pharmacy students in Lithuania. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015; 2015: 172502. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/172502>
2. Walsh E.G., Maher S., Devocelle M., O'Brien P.J., Baird A.W., Brayden D.J. High content analysis to determine cytotoxicity of the antimicrobial peptide, melittin and selected structural analogs. *Peptides*. 2011; 32 (8): 1764–73. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.006
3. Lee W.R., Kim K.H., An H.J., Kim J.Y., Han S.M., Lee K.G., Park K.K. Protective effect of melittin against inflammation and apoptosis on *Propionibacterium acnes*-induced human THP-1 monocytic cell. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; 740: 218–26. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.058
4. Reutsky I.A. Treatment with honey and other beekeeping products. Recommendations for doctors and patients. Moscow: Eksmo, 2007: 448 p. (in Russian)
5. Mahmoud Abdu Al-Samie Mohamed Ali. Studies on bee venom and its medical uses. *Int. J. Adv. Res. Technol.* 2012; 1 (2): 69–83.
6. Lee G., Bae H. Bee venom phospholipase A₂: yesterday's enemy becomes today's friend. *Toxins (Basel)*. 2016; 8 (2): 48.
7. Fletcher D.I., Ganellin C.R., Piergentili A., Dunn P.M., Jenkinson D.H. Synthesis and pharmacological testing of polyaminoquinolines

as blockers of the apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channel (SK(Ca)). *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15 (16): 5457–79.

8. Gural'nik J.F. Apiotherapy. Bee is the source of youth health and life. Moscow: Feniks, 2006. (in Russian)
9. GOST 30426-97. Raw bee poison. Specifications. Minsk, 1997: 14 p. (in Russian)
10. Osterman L.A. Methods of research of proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation: Practical guide. Moscow: Nauka, 1981: 288 p. (in Russian)
11. Cherevko J.A., Boytsenyuk L.I., Vereshchaka I.J. Beekeeping. Moscow: KolosS, 2008: 384 p. (in Russian)
12. Mashkovsky M.D. Medicines: manual for doctors. Moscow: Novaya volna, 2014: 1216 p. (in Russian)
13. Fedoseeva V.N., Kamysheva V.A., Fedoskova T.G., Khaitov R.M., Nekrasova O.V. Tropomiosin and cross-allergic reactions in patients with insect allergy. *Immunologiya*. 2006; 27 (3): 189–91. (in Russian)
14. Chivanov V.D., Eremenko V.I., Zubarev R.A., Knysh A.N. Express analysis of bee venom. Beekeeping. 1993; (9): 46–7.
15. Nikolaeva I.A., Kulaga O.S., Avoyan G.E., Smirnov V.V., Toptygin A.Yu., Pavlenko M.K., et al. Studies of birch wart allergens obtained from pollen collected from 2008 to 2015 years. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 50–6. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16007 (in Russian)

Сведения об авторах

Авоян Гаяне Эммануиловна – мл. науч. сотр. лаборатории моделирования иммунологических процессов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: avoyan.gayane@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4428-0801>

Кулага Ольга Сергеевна – мл. науч. сотр. лаборатории моделирования иммунологических процессов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: olga.surova.94@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1675-3691>

Николаева Ирина Александровна – д-р биол. наук, ведущ. науч. сотр. отдела планирования и координации научных исследований ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: nikolaeva.immune@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7589-5457>

Authors' information

Gayane E. Avoyan – Junior Researcher of Laboratory of Modeling of Immunological Processes of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: avoyan.gayane@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4428-0801>

Olga S. Kulaga – Junior Researcher of Laboratory of Modeling of Immunological Processes of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: olga.surova.94@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1675-3691>

Irina A. Nikolaeva – Dr.Sci, Leader Researcher of the Department for Research Planning and Coordination of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: nikolaeva.immune@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7589-5457>

Андреев Игорь Владимирович – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории моделирования иммунологических процессов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: iva66@list.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6162-6726>

Топтыгин Андрей Юрьевич – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории иммунохимии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: atop2007@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4232-0670>

Черченко Николай Георгиевич – канд. биол. наук, технолог лаборатории моделирования иммунологических процессов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: cherchenk-o@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5714-0045>

Санков Михаил Николаевич – канд. биол. наук, ведущ. науч. сотр. лаборатории моделирования иммунологических процессов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: sankov_m54@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0003-4969-1626>

Мартынов Александр Игоревич – канд. мед. наук, зав. лабораторией моделирования иммунологических процессов, первый зам. директора ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: immune48@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9761-8058>

Гегечкори Владимир Ираклиевич – канд. фарм. наук, старший преподаватель ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация
E-mail: vgegechkori@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8437-1148>

Салтыкова Олеся Владимировна – асп. ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация
E-mail: olesia.saltykova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1055-5969>

Смирнов Валерий Валерьевич – канд. фарм. наук, зав. лабораторией клинической фармакологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: vall@mail.mipt.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

Igor V. Andreev – PhD, Senior Researcher of Laboratory of Modeling of Immunological Processes of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: iva66@list.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6162-6726>

Andrey Yu. Topytgin – PhD, Senior Researcher of Laboratory of Immunochimistry of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: atop2007@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4232-0670>

Nikolay G. Cherchenko – PhD, Technologist of Laboratory of Modeling of Immunological Processes of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: cherchenk-o@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5714-0045>

Mikhail N. Sankov – PhD, Leader Researcher of Laboratory of Modeling of Immunological Processes of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: sankov_m54@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0003-4969-1626>

Alexander I. Martynov – PhD, Head of Laboratory of Modeling of Immunological Processes, First Deputy Director of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: immune48@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9761-8058>

Vladimir I. Gegechkori – Senior Lecturer of I.M. Sechenov 1st MSMU of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation
E-mail: vgegechkori@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8437-1148>

Olesya V. Saltykova – Postgraduate Student of 1st MSMU of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation
E-mail: olesia.saltykova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1055-5969>

Valery V. Smirnov – PhD, Head of Laboratory of Clinical Pharmacology of NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: vall@mail.mipt.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>