

Исследование токсических и аллергенных свойств мелиттина, полученного из отечественного пчелиного яда

Д.м.н. Т.Г. Федоскова¹, А.И. Мартынов¹, Д.м.н. А.Н. Пампура², к.фарм.н. О.В. Миславский¹, Д.В. Шабанов¹, С.Р. Маштакова¹, Е.Д. Головкина¹

¹ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

²ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: изучить токсическую и аллергенную активность мелиттина — основного компонента яда пчел, составляющего 35–50% общей массы сухого яда, с применением различных методов диагностики.

Материал и методы: в работе использован мелиттин из пчелиного яда фирмы Sigma (США) и мелиттин, полученный из отечественного яда пчелиного сырья (ЯПС). Токсическую и аллергенную активность исследуемого пептида изучали на модели различных экспериментальных животных, с разной степенью чувствительности. Изучение уровня специфических IgE осуществляли методом иммуноферментного анализа. С целью изучения сенсibilизирующих свойств мелиттина применен метод активной кожной анафилаксии.

Результаты исследования: показано, что по токсическому эффекту отечественный мелиттин из ЯПС не уступает мелиттину зарубежного производителя. Найдена модель экспериментальных животных, наиболее чувствительных к токсическим свойствам мелиттина. Отмечено совпадение дозозависимого эффекта по острой токсичности. При применении наименее токсических доз мелиттина ($0,1 LD_{50}$) изучены аллергизирующие свойства исследуемого пептида.

Заключение: наличие у мелиттина выраженных токсических свойств и слабых аллергенных свойств свидетельствует о нецелесообразности его использования в составе противоаллергических препаратов.

Ключевые слова: инсектная аллергия, пчела медоносная, *Apis mellifera*, пчелиный яд, мелиттин, токсические свойства, аллергенные свойства.

Для цитирования: Федоскова Т.Г., Мартынов А.И., Пампура А.Н. и др. Исследование токсических и аллергенных свойств мелиттина, полученного из отечественного пчелиного яда. РМЖ. 2020;12:50–55.

ABSTRACT

Study of the toxic and allergenic properties of melittin obtained from honey bee venom

T.G. Fedoskova¹, A.I. Martynov¹, A.N. Pampura², O.V. Mislavsky¹, D.V. Shabanov¹, S.R. Mashtakova¹, E.D. Golovkina¹

¹State Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow

²Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Aim: to study the toxic and allergenic activity of melittin, the main component of bee venom, which makes up 35–50% of the venom total dry weight, using various diagnostic methods.

Patients and Methods: we used melittin from the bee venom of the company Sigma (USA) and melittin obtained from domestic raw bee venom (RBV). The toxic and allergenic activity of the studied peptide was studied on the model of various laboratory animals with different degrees of sensitivity. Specific IgE level was studied by the method of enzyme Immunoassay. The method of active cutaneous anaphylaxis was applied in order to study the melittin sensitizing properties.

Results: it was shown that the toxic effect of domestic melittin from RBV was not inferior to the foreign melittin. Laboratory animal model most sensitive to the melittin toxic properties was found. The coincidence of the dose-dependent effect for acute toxicity was noted. The allergenic properties of the studied peptide were studied when administrating the least toxic doses of melittin ($0.1 LD_{50}$).

Conclusion: the presence of pronounced toxic properties and weak allergenic properties of melittin indicate that it is not advisable to use melittin as part of antihistamines.

Keywords: insect sting allergy, honey bee, *Apis mellifera*, bee venom, melittin, toxic properties, allergenic properties.

For citation: Fedoskova T.G., Martynov A.I., Pampura A.N. et al. Study of the toxic and allergenic properties of melittin obtained from honey bee venom. RMJ. 2020;12:50–55.

ВВЕДЕНИЕ

Инсектная аллергия (ИА) представляет собой иммуноопосредованные реакции, возникающие при укусах насекомых, при соприкосновении с ними, вдыхании частиц тел насекомых и/или продуктов их жизнедеятельности.

Аллергические реакции на ужаление пчелой, осой, шершнем — насекомыми, относящимися к отряду перепончатокрылых (*Hymenoptera*), характеризуются тяжестью симптомов, бурным течением и возможностью летального исхода [1].

Распространенность ИА к яду перепончатокрылых в России составляет 0,4–8% [2]. Среди взрослого населения Европы сенсибилизацию к жалящим насекомым (ЖН) выявляют в 9,2–28,7% случаев, а статистическое наблюдение системных реакций колеблется от 0,3% до 7,5% [3, 4]. В России системные реакции к яду ЖН отмечены у 5,3% обследованных пациентов [5]. Смертность от анафилактических реакций на яд ЖН составляет 0,03–0,48% на 1 млн населения ежегодно [6].

Согласно данным WHO/IUIS субкомитета по номенклатуре аллергенов в составе яда медоносных пчел вида *Apis mellifera* содержится 12 аллергенов: Арі m1 — фосфолипаза А2, Арі m2 — гиалуронидаза, Арі m3 — кислая фосфатаза, Арі m4 — мелиттин, Арі m5 — дипептидилпептидаза IV (аллерген С), Арі m6 — ингибитор протеазы, Арі m7 — протеаза, Арі m8 — карбоксилэстераза, Арі m9 — карбоксипептидаза, Арі m10 — икарапин (богатый углеводами протеин), Арі m11.0101, Арі m11.0201 — главные протеины молочка для питания матки (маточного молочка) 8 и 9, Арі m12 — вителлогенин [6]. Известно, что наивысшую аллергенную активность проявляют фосфолипаза А2 (Арі m1), гиалуронидаза (Арі m2), кислая фосфатаза (Арі m3). Аллергенную активность проявляет и мелиттин (Арі m4) [1], который является основным компонентом яда пчелиного (ЯП). Это щелочной пептид, состоящий из 26 аминокислот (молекулярная масса 2840 Да) [7–10], составляет 35–50% общей массы сухого яда. Мелиттин образует в растворе нити, которые могут создать впечатление о большей молекулярной массе. Он способен находиться в растворе в равновесном состоянии в виде мономера или агрегата (димер-тетрамер) [8, 11]. Особенность строения мелиттина определяет не только его поверхностную активность как детергента, но и исключительную мембранную токсичность на клеточном и субклеточном уровнях. Повреждение мембран клеток происходит, главным образом, посредством увеличения проницаемости. Это приводит к усиленному выходу ионов калия и в последующем — к цитолизу. Токсическое действие мелиттина усиливается при взаимодействии с органеллами клеток, что вызывает высвобождение ферментов из лизосом или медиаторов (гистамин, брадикинин) из гранул тучных клеток, базофилов крови [12] и тромбоцитов. Мелиттин реагирует также и со связанными с мембранами ферментными системами. Например, он повреждает катион-активированную аденозинтрифосфатазу и ацетил-холинэстеразу и прерывает окислительное фосфорилирование в митохондриях [13]. Эти эффекты свидетельствуют о высокой токсичности мелиттина.

Во множестве зарубежных исследований сообщалось, что мелиттин может индуцировать апоптоз и проявлять антипролиферативные свойства. Мелиттин мог бы стать идеальным средством против рака, однако его применение ограничено литическими свойствами [14].

Мелиттин обладает потенциалом для использования в адъювантной иммунотерапии. Ответ иммунной системы на различные раздражители зависит от секреции различных метаболитов из макрофагов. Одним из мощных стимулов является липополисахарид (ЛПС) — компонент, выделенный из грамотрицательных бактерий, который индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов в культурах клеток макрофагов. Эта секреция усиливается, когда ЛПС сочетается с мелиттином. Способность мелиттина повышать высвобождение фактора некроза опухоли α ,

интерлейкинов (ИЛ-1 β , -6, -10), цитокинов из макрофагов была исследована на клеточной линии ТНР-1. Реакции на мелиттин и ЛПС, применяемые отдельно или в комбинации, характеризовались метаболическим профилированием, а результаты метаболизма использовались для оценки потенциала мелиттина в качестве иммунной адъювантной терапии. Добавление мелиттина усиливало выделение воспалительных цитокинов, индуцированных ЛПС. Уровни полярных и неполярных метаболитов были значительно изменены ($p < 0,05$) после активации клеток комбинацией ЛПС и мелиттина по сравнению с необработанными контрольными клетками. В целом результаты этого исследования показали, что мелиттин может иметь потенциальное применение в качестве адъюванта вакцины [15].

Неоднократно были предприняты попытки создания лекарственных форм аллергенов для лечения ИА у больных с аллергией к яду пчел. В патенте RU 2279888 С1 [16] указана следующая информация: аллергоид для аллерген-специфической иммунотерапии больных с аллергическими реакциями на ужаления пчелами, характеризующийся тем, что он содержит аллергенные фракции с молекулярной массой 3–12, 16–31, 38–46, а также 20 и 60 кДа и полученный путем полимеризации суммарно аллергенной фракции формальдегидом и стабилизации NaBH₄. Данный патент предусматривает использование мелиттина (3 кДа) в противоаллергическом препарате. В другом патенте, RU 2010 130 532 А [17], указано, что созданный препарат был получен путем диализа нативного пчелиного яда с использованием мембраны с границей пропускания 10 кДа. Первичные аминокислоты белковых частей мелиттин-истощенного пчелиного яда подвергали карбамилрованию или тиокарбамилрованию либо образованию групп гуанидинового типа для получения мономерного аллергоида. Данный патент в отличие от предыдущего патента не предусматривал использование мелиттина в противоаллергическом препарате.

Таким образом, существует необходимость в проведении исследований, позволяющих подтвердить или опровергнуть возможность использования мелиттина в противоаллергических препаратах.

Как правило, для работы используют мелиттин из пчелиного яда фирмы Sigma (США), отличающегося высокой стоимостью. Интерес представляет изучение токсических и аллергенных свойств мелиттина из отечественного яда пчелиного сырца (ЯПС).

Цель настоящей работы — изучение токсических и аллергенных свойств мелиттина пчелиного яда отечественного производителя.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярных механизмов аллергии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Исследуемые вещества: мелиттин из пчелиного яда фирмы Sigma (США) — белый порошок без запаха, а также мелиттин, полученный из ЯПС ООО «Апис», — белый порошок без запаха. Контрольное вещество — фосфатно-солевой буферный раствор, рН от 7,2 до 7,4, фирмы Sigma.

Для изучения *токсических свойств* мелиттина использованы лабораторные животные (самцы, каждый вид — по 90 голов): беспородные мыши массой 20–22 г, мыши линии Balb/c массой 20–22 г, крысы линии Wistar массой 180–200 г, морские свинки массой 250–300 г.

Таблица 1. Определение доз LD₅₀ мелиттина на различных видах лабораторных животных

Вид лабораторного животного	Исследуемые дозы, мг/кг
Беспородные мыши	10, 11, 12, 13 и 14
Мыши линии Balb/c	5, 7, 8, 9 и 10
Крысы линии Wistar	16, 17, 18, 19 и 20
Морские свинки	1, 2, 3, 4 и 5

Дизайн исследования токсических свойств мелиттина при однократном внутривенном (в/в) введении лабораторным животным представлен в таблицах 1, 2. Количество животных на каждую дозу мелиттина составляло 10 голов [18]. При определении токсичности учитывался показатель опасности ядовитых и умеренно-токсичных веществ, а именно LD₅₀ — средняя доза вещества, вызывающая гибель половины животных исследуемой группы.

Аллергенные свойства мелиттина изучались с применением исследуемого пептида, полученного из ЯПС ООО «Апис». В качестве контроля использовались: адъювант гидроксид алюминия (Sigma, США), в качестве сравнения — очищенный ЯПС ООО «Апис» (Россия), белый кристаллический порошок без запаха [43].

Лабораторные животные: мыши самцы линии Balb/c массой 20–22 г (90 голов), морские свинки самцы массой 250–300 г (90 голов).

Дизайн исследования аллергенных свойств мелиттина при 3-кратном введении исследуемого вещества лабораторным животным представлен в таблице 3.

Статистический анализ данных проводился с использованием программы Statistica (version 8.0, StaSoft Inc., США). Все данные были выражены как среднее значение ± ошибка среднего. Статистическая значимость была оценена при помощи t-критерия Стьюдента, различия считались значимыми при p ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕЛИТТИНА

Проведено исследование токсических свойств мелиттина при однократном в/в введении беспородным мышам самцам и мышам самцам линии Balb/c. LD₅₀ для беспородных мышей составила 13 мг/кг, для мышей линии Balb/c — 9 мг/кг при введении как мелиттина зарубежного производства, так и мелиттина из ЯПС. Полученные данные демонстрируют тождественность токсического эффекта мелиттина отечественного и зарубежного производства. Поэтому дальнейшие исследования токсических свойств мелиттина проводили, не используя дорогостоящий мелиттин производства США.

При проведении исследования токсических свойств мелиттина из ЯПС ООО «Апис» при однократном в/в введении крысам линии Wistar и морским свинкам отмечено, что LD₅₀ составила 18 мг/кг и 3 мг/кг соответственно.

Также было проведено исследование токсических свойств мелиттина из ЯПС при многократном в/в введении беспородным мышам в следующих дозах: 1,3 мг/кг (0,1 LD₅₀) и 3,25 мг/кг (0,25 LD₅₀), по 10 мышей на каждую дозу, и мышам линии Balb/c 0,9 мг/кг (0,1 LD₅₀) и 2,25 мг/кг (0,25 LD₅₀), по 10 мышей на каждую дозу. Продолжитель-

Таблица 2. Дизайн исследования токсических свойств мелиттина при многократном в/в введении лабораторным животным

Вид лабораторного животного (группа)	Контрольное вещество и исследуемые дозы мелиттина, мг/кг
Беспородные мыши (группа 1)	Фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 7,2 до 7,4
Беспородные мыши (группа 2)	1,3 (0,1 LD ₅₀)
Беспородные мыши (группа 3)	3,25 (0,25 LD ₅₀)
Мыши линии Balb/c (группа 4)	Фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 7,2 до 7,4
Мыши линии Balb/c (группа 5)	0,9 (0,1 LD ₅₀)
Мыши линии Balb/c (группа 6)	2,25 (0,25 LD ₅₀)
Крысы линии Wistar (группа 7)	Фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 7,2 до 7,4
Крысы линии Wistar (группа 8)	1,8 (0,1 LD ₅₀)
Крысы линии Wistar (группа 9)	4,5 (0,25 LD ₅₀)
Морские свинки (группа 10)	Фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 7,2 до 7,4
Морские свинки (группа 11)	0,3 (0,1 LD ₅₀)
Морские свинки (группа 12)	0,75 (0,25 LD ₅₀)

Примечание. Мелиттин вводился с 1-го по 20-й день эксперимента, с 21-го по 40-й день наблюдалось течение восстановительного периода. Масса животных определялась на 0, 10, 20, 30, 40-е сут.

Таблица 3. Дизайн исследования групп мышей линии Balb/c для определения специфических IgE и морских свинок для проведения реакции активной кожной анафилаксии, сенсibilизированных мелиттином и очищенным ЯП

Наименование группы	Исследуемые дозы мелиттина и очищенного ЯП, мг/кг *	Количество животных на каждую дозу мелиттина и ЯП
Мыши, сенсibilизированные мелиттином	0,9	10
Мыши, сенсibilизированные очищенным ЯП	1,8	20
Морские свинки, сенсibilизированные мелиттином	0,3	10
Морские свинки, сенсibilизированные очищенным ЯП	0,6	20

Примечание. * — способ введения во всех случаях — в/в 3-кратно с интервалом 7 дней.

ность введения составила 20 дней с последующим 20-дневным периодом наблюдения.

Во время курса введения мелиттина и восстановительного периода проводили определение массы животных на 0, 10, 20, 30, 40-й день. Масса тела (г) мышей в контрольной группе (группа 1): до введения растворителя — 21,4 ± 1,6;

10-й день курса введения — $23,6 \pm 1,8$; 20-й день курса введения — $25,8 \pm 1,5$; 30-й день после курса введения — $27,2 \pm 1,4$; 40-й день после курса введения — $29,5 \pm 1,7$. Масса тела (г) мышей в экспериментальной группе (группа 2): до введения мелиттина в дозе $1,3 \text{ мг/кг}$ — $21,2 \pm 1,5$; 10-й день курса введения — $23,3 \pm 1,1$; 20-й день курса введения — $24,5 \pm 1,6$; 30-й день после курса введения — $25,8 \pm 1,3$; 40-й день после курса введения — $26,9 \pm 1,5$. Масса тела (г) мышей в экспериментальной группе (группа 3): до введения мелиттина в дозе $3,25 \text{ мг/кг}$ — $20,6 \pm 1,7$; 10-й день курса введения — $21,9 \pm 1,2$; 20-й день курса введения — $21,8 \pm 1,5$; 30-й день после курса введения — $23,7 \pm 1,3$; 40-й день после курса введения — $24,8 \pm 1,4$.

Результатами дальнейшего исследования было определение массы тела у мышей линии Balb/c в период курса введения мелиттина и в восстановительном периоде. Масса тела (г) мышей в контрольной группе (группа 4): до введения растворителя — $21,3 \pm 1,4$; 10-й день курса введения — $23,4 \pm 1,7$; 20-й день курса введения — $25,2 \pm 1,5$; 30-й день после курса введения — $27,1 \pm 1,3$; 40-й день после курса введения — $29,3 \pm 1,6$. Масса тела (г) мышей в экспериментальной группе (группа 5): до введения мелиттина в дозе $0,9 \text{ мг/кг}$ — $20,8 \pm 1,3$; 10-й день курса введения — $23,1 \pm 1,5$; 20-й день курса введения — $24,7 \pm 1,6$; 30-й день после курса введения — $25,6 \pm 1,7$; 40-й день после курса введения — $26,7 \pm 1,4$. Масса тела (г) мышей в экспериментальной группе (группа 6): до введения мелиттина в дозе $2,25 \text{ мг/кг}$ — $21,5 \pm 1,2$; 10-й день курса введения — $22,7 \pm 1,8$; 20-й день курса введения — $21,4 \pm 1,3$; 30-й день после курса введения — $22,6 \pm 1,3$; 40-й день после курса введения — $23,5 \pm 1,1$. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Проведено также исследование токсических свойств мелиттина при многократном в/б введении крысам линии Wistar в следующих дозах: $1,8 \text{ мг/кг}$ ($0,1 \text{ LD}_{50}$) и $4,5 \text{ мг/кг}$ ($0,25 \text{ LD}_{50}$), по 10 крыс на каждую дозу, и морским свинкам в следующих дозах: $0,3 \text{ мг/кг}$ ($0,1 \text{ LD}_{50}$) и $0,75 \text{ мг/кг}$ ($0,25 \text{ LD}_{50}$), по 10 морских свинок на каждую дозу. Продолжительность введения также составила 20 дней с последующим 20-дневным периодом наблюдения. Определение массы животных осуществлялось на 0, 10, 20, 30, 40-й день эксперимента. Масса тела (г) крыс в контрольной группе (группа 7): до введения растворителя — $192,5 \pm 7,6$; 10-й день курса введения — $205,2 \pm 9,2$; 20-й день курса введения — $219,8 \pm 9,7$; 30-й день после курса введения — $232,8 \pm 10,6$; 40-й день после курса введения — $246,2 \pm 11,3$. Масса тела (г) крыс в экспериментальной группе (группа 8): до введения мелиттина в дозе $1,8 \text{ мг/кг}$ — $195,7 \pm 8,4$; 10-й день курса введения — $207,1 \pm 7,9$; 20-й день курса введения — $217,6 \pm 8,9$; 30-й день после курса введения — $229,4 \pm 10,3$; 40-й день после курса введения — $242,3 \pm 10,7$. Масса тела (г) крыс в экспериментальной группе (группа 9): до введения мелиттина в дозе $4,5 \text{ мг/кг}$ — $193,4 \pm 8,3$; 10-й день курса введения — $202,8 \pm 7,5$; 20-й день курса введения — $211,5 \pm 8,6$; 30-й день после курса введения — $223,9 \pm 9,4$; 40-й день после курса введения — $235,6 \pm 10,3$.

Масса тела (г) морских свинок в контрольной группе (группа 10): до введения растворителя — $273,4 \pm 10,2$; 10-й день курса введения — $287,5 \pm 11,6$; 20-й день курса введения — $302,7 \pm 10,8$; 30-й день после курса введения — $317,4 \pm 11,9$; 40-й день после курса введения — $329,8 \pm 12,3$. Масса тела (г) морских свинок в экспериментальной груп-

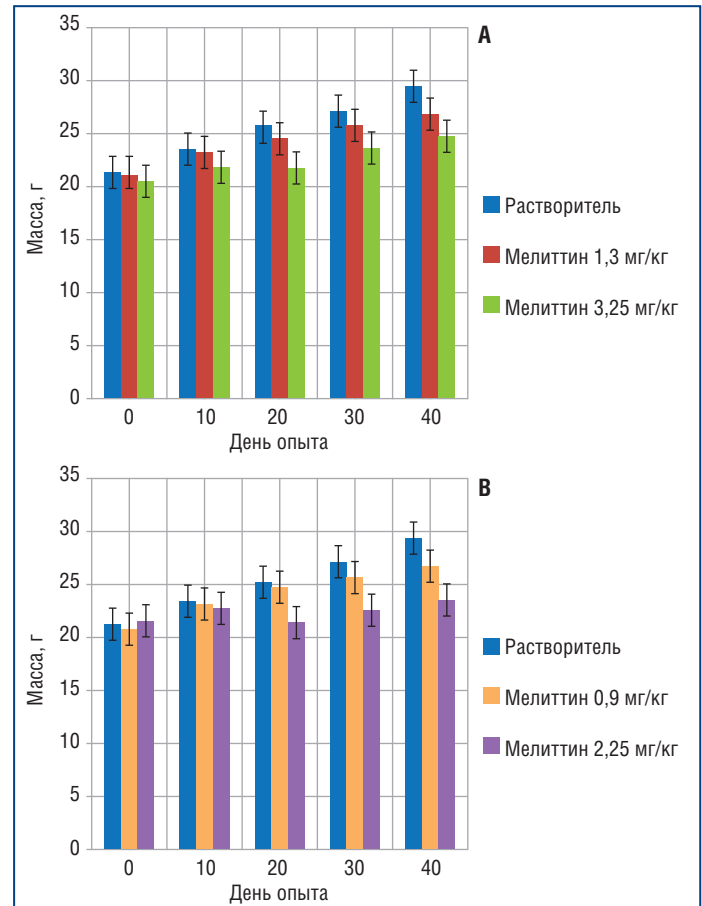


Рис. 1. Масса тела беспородных мышей (А) и мышей линии Balb/c (В) в период курса введения и в восстановительном периоде

пе (группа 11): до введения мелиттина в дозе $0,3 \text{ мг/кг}$ — $276,3 \pm 10,7$; 10-й день курса введения — $284,8 \pm 11,2$; 20-й день курса введения — $294,5 \pm 11,2$; 30-й день после курса введения — $305,3 \pm 11,7$; 40-й день после курса введения — $315,6 \pm 12,6$. Масса тела (г) морских свинок в экспериментальной группе (группа 12): до введения мелиттина в дозе $0,75 \text{ мг/кг}$ — $269,8 \pm 10,5$; 10-й день курса введения — $282,1 \pm 10,3$; 20-й день курса введения — $288,1 \pm 11,2$; 30-й день после курса введения — $295,5 \pm 11,6$; 40-й день после курса введения — $305,4 \pm 11,4$. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что наиболее стойкими к действию мелиттина являются крысы — доза LD_{50} мелиттина составила 18 мг/кг , а наиболее чувствительными — мыши линии Balb/c — 9 мг/кг и морские свинки — 3 мг/кг . Отмечено также, что динамика увеличения массы тела в восстановительном периоде (21–40-й дни опыта) у крыс идет с большим приростом массы, чем у морских свинок, а также то, что мелиттин в дозе $0,25 \text{ LD}_{50}$ оказывает в 2 раза большее токсическое действие, чем в дозе $0,1 \text{ LD}_{50}$.

Таким образом, найдена модель экспериментальных животных, наиболее чувствительных к токсическим свойствам мелиттина, а показанная в работе тождественность токсической активности мелиттина из ЯПС и яда зарубежного производства позволила в дальнейшей работе по изучению аллергенных свойств мелиттина использовать изучаемый пептид из ЯП отечественного производителя.

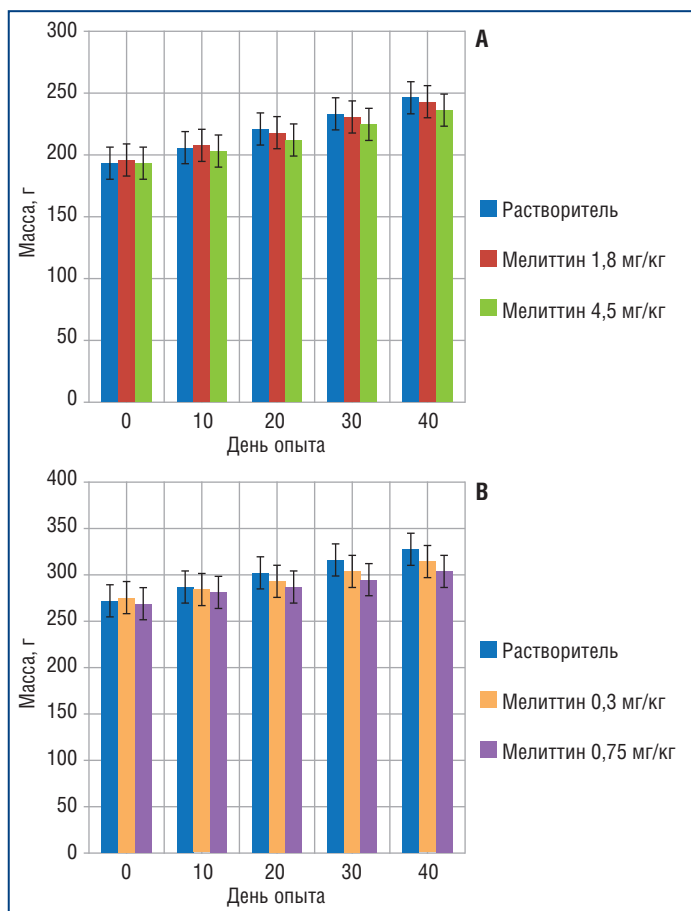


Рис. 2. Масса тела крыс (А) и морских свинок (В) в период курса введения и в восстановительном периоде

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГЕННЫХ СВОЙСТВ МЕЛИТТИНА

Определение специфических IgE (slgE) в сыворотке крови животных после сенсibilизации мелиттином и очищенным ЯП. Проведено исследование аллергенных свойств мелиттина из ЯП при 3-кратном в/б введении мышам линии Balb/c с адьювантом (гидроксидом алюминия) в дозе 0,9 мг/кг на 1 животное и очищенного ЯП с адьювантом в дозе 1,8 мг/кг на 1 животное, 3-кратно с интервалом 7 дней. На 21-й день от начала сенсibilизации проводили методом иммуноферментного анализа определение уровней slgE в сыворотке крови животных

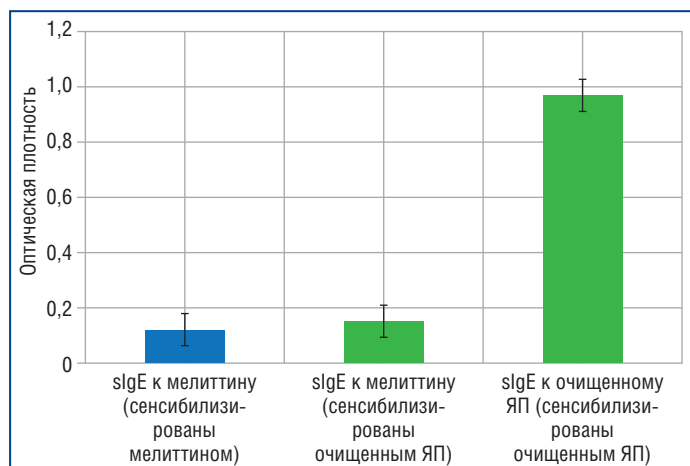


Рис. 3. Результаты определения slgE в сыворотке крови животных после сенсibilизации мелиттином и очищенным ЯП

с использованием набора Mouse IgE ELISA Set (Becton Dickinson, США) по уровню оптической плотности (optical density — OD): уровень slgE к мелиттину у мышей, сенсibilизированных мелиттином, составил 0,118±0,016 OD; уровень slgE к мелиттину у мышей, сенсibilизированных ЯП, — 0,146±0,014 OD (p<0,05); уровень slgE к ЯП у мышей, сенсibilизированных ЯП, — 0,963±0,047 OD. Результаты представлены на рисунке 3. Уровень slgE к мелиттину был незначительно выше у мышей после сенсibilизации ЯП в сравнении с уровнем slgE у мышей, сенсibilизированных одним мелиттином. Для сравнения проведенной сенсibilизации к ЯП определяли уровень slgE к очищенному ЯП.

Проведено исследование аллергенных свойств мелиттина при в/б введении морским свинкам с адьювантом (гидроксидом алюминия) в дозе 0,3 мг/кг на 1 животное и очищенного ЯП с адьювантом в дозе 0,6 мг/кг на 1 животное, 3-кратно с интервалом 7 дней. На 21-й день от начала сенсibilизации проводили постановку реакции активной кожной анафилаксии (АКА). Результаты исследования по определению уровней гомоцитотропных специфических антител, определяемых по вычислению среднего диаметра окрашенных красителем синим Эванса пятен (см × см) после в/к введения различных доз мелиттина, представлены в таблице 4.

Значения средних диаметров окрашенных пятен у морских свинок, сенсibilизированных мелиттином, после

Таблица 4. Результаты постановки реакции АКА на морских свинок после сенсibilизации мелиттином и очищенным ЯП

Наименование группы	Исследуемые дозы мелиттина и очищенного ЯП, мг/кг	Разрешающие дозы мелиттина и очищенного ЯП, мкг / 0,1 мл	Средний диаметр пятен, окрашенный красителем синим Эванса, см
Морские свинки, сенсibilизированные мелиттином, разрешение мелиттином	0,3	12,5	0,27×0,30±0,04×0,02
		25	0,32×0,35±0,05×0,05
		50	0,40×0,42±0,05×0,05
		100	0,41×0,44±0,04×0,06
Морские свинки, сенсibilизированные очищенным ЯП, разрешение мелиттином	0,6	12,5	0,31×0,34±0,04×0,05
		25	0,36×0,43±0,05×0,06
		50	0,42×0,45±0,05×0,06
		100	0,51×0,60±0,05×0,04
Морские свинки, сенсibilизированные очищенным ЯП, разрешение очищенным ЯП	0,6	12,5	0,50×0,54±0,04×0,06
		25	0,62×0,68±0,07×0,10
		50	0,76×0,88±0,08×0,08
		100	0,98×1,14±0,10×0,13

в/к введения мелиттина были незначительно меньше, чем у морских свинок, сенсibilизированных ЯП, после разрешения реакции АКА мелиттином.

Проведено также исследование сыворотки крови 16 пациентов с аллергией к ЯП по определению уровней sIgE к ЯП и мелиттину, определяемых по оптической плотности, с использованием набора фирмы Dr. Foote (Германия). Получены следующие результаты: у 5 пациентов уровень sIgE к ЯП составил $0,765 \pm 0,058$ OD (3 класс), уровень sIgE к мелиттину — $0,169 \pm 0,037$ OD (1 класс), уровни sIgE к ПЯ и мелиттину в сыворотке крови 11 пациентов составили $0,236 \pm 0,043$ OD (2 класс) и $0,078 \pm 0,026$ OD (0 класс) соответственно. Результаты представлены на рисунке 4.

Проведенные исследования свидетельствуют о слабых аллергенных свойствах мелиттина по сравнению с ЯП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изученные показатели динамики увеличения массы тела различных животных в восстановительном периоде при воздействии различных доз мелиттина, выраженное токсическое воздействие $0,25 LD_{50}$ в сравнении с дозой $0,1 LD_{50}$, а также низкий уровень содержания специфических IgE в крови животных, сенсibilизированных мелиттином, в сравнении с уровнем исследуемых антител при сенсibilизации ЯП, небольшие значения средних диаметров окрашенных пятен у морских свинок, сенсibilизированных мелиттином, после в/к введения указанного белка, наличие низкого уровня специфических IgE в крови пациентов с инсектной аллергией к яду пчел свидетельствуют о наличии у мелиттина выраженных токсических свойств, но слабых аллергенных, что указывает на нецелесообразность использования исследуемого пептида в составе противоаллергических препаратов. Наличие доказанного токсического эффекта мелиттина позволяет сделать вывод о целесообразности применения исследуемого белка с выраженными цитотоксическими свойствами в составе препаратов для лечения онкопатологии, заболеваний опорно-двигательного аппарата, а также препаратов с антибактериальной направленностью.

Литература

1. Гушин И.С., Читаева В.Г. Аллергия к насекомым М.: Фармарус Принт; 2003. [Gushchin I.S., Chitaeva V.G. Insect Allergy. M.: Farmarus Print; 2003 (in Russ.).]
2. Швец С.М. Аллергические реакции на яд жалящих насекомых. Российский аллергологический журнал. 2004;3:9–18. [Shvets S.M. Allergic reactions to the poison of stinging insects. Russian Allergological Journal. 2004;3:9–18 (in Russ.).]
3. Antonicelli L., Bilo M.B., Bonifazi F. Epidemiology of hyme-noptera allergy. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2002;2:341–346.
4. Bilo M.B., Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2008;8:330–337.
5. Шабанов Д.В., Мартынов А.И., Федоскова Т.Г. и др. Проблема аллергии к жалящим насекомым в условиях мегаполиса: распространенность, патогенетическое лечение. Сборник материалов IX Международного симпозиума «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения». Франтишковы Лазне, 25 октября — 1 ноября 2014 г. [Shabanov D.V., Martynov A.I., Fedoskova T.G. et al. The

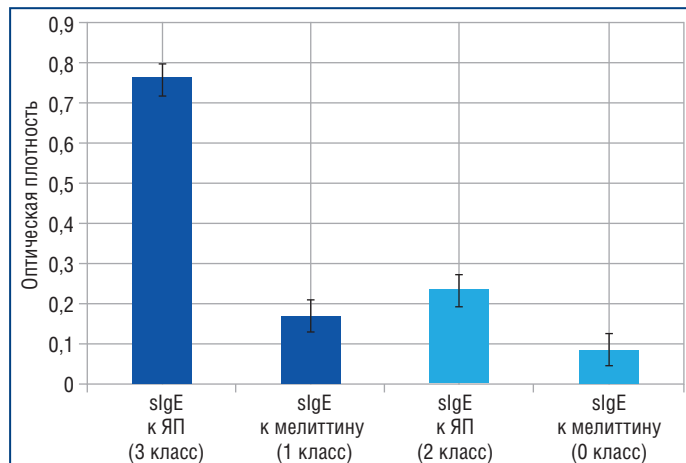


Рис. 4. Уровни sIgE к ЯП и мелиттину в сыворотке крови пациентов с аллергией к ЯП

problem of allergy to stinging insects in a megacity: Prevalence, Pathogenetic treatment. Proceedings of the IXth International Symposium "Human Ecology and Medical and Biological Safety of the Population". Františkovy Lázně, October 25 — November 1, 2014 (in Russ.).

6. Radauer C., Nandy A., Ferreira F. et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. Allergy. 2014;69:413–419.
7. Brown T.C. Reactions to honeybee stings: an allergic prospective. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2013;13:365–371.
8. Гушин И.С., Читаева В.Г. Повышенная чувствительность к насекомым. Итоги науки и техники. Иммунология. 1987;16:49–99. [Gushchin I.S., Chitaeva V.G. Hypersensitivity to insects.. Collection: Results of science and technology. Immunology. 1987;16:49–99 (in Russ.).]
9. Гушин И.С., Читаева В.Г. Аллергия к жалящим насекомым. Терапевтический архив. 1987;1:111–118. [Gushchin I.S., Chitaeva V.G. Allergy to stinging insects. Therapeutic archive. 1987;1:111–118 (in Russ.).]
10. Levin I.W. Vibrational studies of model membrane-melittin interactions. Insect poisons, allergens and other invertebrate. Ed. Tu A.T., Dekker M. Inc. New York, Basel. 1983;2:87–105.
11. Talbot J.C., Bernard E., Maurel J.P. et al. Melittin — phospholipid interactions: binding of the mono- and tetrameric form of this peptide and perturbations of the thermotropic of bilayers. Toxicon. 1982;20(1):199–202.
12. Iwadate M., Asakura T., Williamson M.P. The structure of the melittin tetramer at different temperatures-an NOE-based calculation with chemical shift refinement. Eur. J. Biochem. 1998;257(2):479–487.
13. Domitas E.M., Hider R.C. Honey bee venom. Bee Wored. 1987;68(2):51–70.
14. Kreil G., Kreil-Kiss G. The isolation of N-formyllysine from a polypeptide present in the bee venom. Biochem Biophys Res Commun. 1967;27:275–280.
15. Alqarni A.M., Ferro V.A., Parkinson J.A. et al. Effect of Melittin on Metabolomic Profile and Cytokine Production in PMA-Differentiated THP-1 Cells. Vaccines (Basel). 2018;6(4):72.
16. RU Патент № 2279888. Аллергоид из яда пчел для аллерген-специфической иммунотерапии больных с аллергическими реакциями на ужаление пчелами и способ его получения. Федосеева В.Н., Орлова И.А., Мартынов А.И., Федоскова Т.Г. Дата публикации: 17.11.2004. [Patent No. 2279888. An Allergoid from bee venom for allergen-specific immunotherapy of patients with allergic reactions to bee sting and a method for its preparation. Fedoseeva V.N., Orlova I.A., Martynov A.I., Fedoskova T.G. Publication date: 17.11.2004 (in Russ.).]
17. RU Патент 2010 130 532 А. Аллергены и аллергоиды из пчелиного яда. Мистрелло Д., Ронкароло Д., Дзанони Д., Фаланджи П. Аллергены и аллергоиды из пчелиного яда. Дата публикации: 27.01.2012. [Patent 2010 130 532 А. Allergens and allergoids from bee venom. Mistrello D., Roncarolo D., Zanoni D., Falanji P. Allergens and allergoids from bee venom. publication date: 27.01.2012 (in Russ.).]
18. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. [Mironov A.N., Bunyatyan N.D., Vasiliev A.N. et al. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. M.: Grief and K; 2012 (in Russ.).]