

Пчелиный яд

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

Пчелиный яд – это секрет ядовитых желез медоносных пчел. Большая ядовитая железа состоит из длинной тонкой трубочки с развилкой на конце и с резервуаром, в котором накапливается яд. Стенки железы выстланы слоем железистых клеток, выделяющих кислый секрет. Длина железы рабочих пчел из различных семей колеблется в широких пределах (от 9 до 20 мм). Установлено, что между длиной ядовитой железы и злобливостью существует прямая зависимость. Ее секрет имеет кислую реакцию. Малая ядовитая железа находится у основания салазок жала, представляет собой короткую трубочку. Ее секрет имеет щелочную реакцию. Отдельно секреты этих желез ядовитых свойств не имеют. Ядовитые свойства приобретаются при смешивании секретов большой и малой ядовитых желез, что обеспечивает образование пчелиного яда в момент ужаления.

Железы и жало имеются только у матки и рабочих пчел, у которых яд выделяется с 6-7 дневного возраста, но наиболее активно в 10-18-дневном возрасте. Накопление яда наблюдается с 3 до 20 дневного возраста. В железе накапливается около 0,2 мг яда. Ядоносные резервуары достигают наибольшей заполненности на 14-20-е сутки после отрождения рабочей пчелы и сохраняют свой объем в течение ее жизни. При отборе яда у пчел до 20 суточного возраста с сохранением целостности ядоносного аппарата яд в ядоносном резервуаре может восстанавливаться за счет секреции ядовитых желез. Систематически отбирая яд у пчелы, можно получить от нее в 2 раза больше яда, чем она нарабатывает его обычно, без расходования. В течение жизни рабочая пчела может секретировать в среднем 0,3 мг яда.

Наибольшего развития ядовитая железа достигает у летних (июльских) пчел, она меньше у весенних (майских) и осенних (сентябрьских) поколений. Длина ядовитой железы, характеризующая степень ее развитости, соответствует степени агрессивности пчел разных рас. Наибольшая длина железы у среднерусских, наименьшая – у серых горных кавказских; крайние пчелы занимают промежуточное положение. Среднерусские пчелы с первых дней жизни имеют развитые железы, а у серых горных кавказских они достигают наивысшего развития к 14-му дню.

Основой получения пчелиного яда является воздействие на рабочих пчел каких-либо раздражителей, вызывающих реакцию ужаления и обеспечивающих целостность жалоносного аппарата. В настоящее время используется электростимуляция в технологии отбора пчелиного яда.

Ядопродуктивность пчелиных семей выражается средним количеством пчелиного яда, полученным с 1 пчелиной семьи за 1 постановку устройства для получения пчелиного яда. Ядопродуктивность зависит от ряда показателей: расовой принадлежности пчел, возраста, интенсивности раздражения, физиологического состояния пчел.

За сезон получают от семьи 1-2 г яда без снижения ее медопродуктивности или до 10 г с потерей производства меда.

В республике Молдова при отборе яда в утренние часы (с 5 до 9 часов) с продолжительностью сеанса 45-60 минут и периодичностью 1 отбор в 12 дней максимальная продуктивность составляла 767 мг яда за 1 сеанс и 3,5 г яда за сезон с 1 пчелиной семьи.

Физиологическое состояние пчел является одним из факторов, определяющих ядопродуктивность пчелиных семей. Из большого количества параметров, характеризующих физиологическое состояние, наиболее важными для ядопродуктивности является сила семей и суточный принос нектара. Существует линейная зависимость между силой семей и ядопродуктивностью. Максимальное количество яда было получено от семей имеющих силу 28 – 30 улочек ($1980 \pm 186,6$ мг), в этом случае и расчетная удельная ядопродуктивность была также максимальной ($0,206$ мг/см²). Наименьшее количество яда было получено при постановке одной ядоприемной кассеты в искусственно созданную семью с силой в 1 улочку. Сила семей подвержена сезонным изменениям, поэтому меняется и ядопродуктивность пчелиных семей. Максимальная ядопродуктивность отмечается в июле ($558 \pm 46,2$ мг) при силе семей 12-14 улочек, в этот же период максимальна относительная ядопродуктивность, которая составляла $40,466$ мг/ул.

Ядопродуктивность пчелиных семей в значительной мере зависит от количества нектара, приносимого пчелами в светлое время суток. Наибольшее количество яда можно получить в случае отрицательного баланса приносимого нектара и потребляемого меда. В такой ситуации отсутствует грязный яд. При балансе нектара и меда отмечено снижение ядопродуктивности. Увеличение приноса нектара сопровождается резким снижением ядопродуктивности, а при показаниях контрольного улья 2,5 – 3,0 кг практически весь яд является загрязненным. При интенсивном медосборе лучше использовать надгнездовой способ получения яда при помощи вертикальной конструкции ядоприемных кассет.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И СВОЙСТВА

Пчелиный яд представляет собой бесцветную густую опалисцирующую жидкость с резким запахом и горьким вкусом, имеет кислую реакцию (pH – 4,5-5,5). Плотность яда равна $1,1313$ кг/м³. Устойчив при замораживании. Разрушается окислителями (например, перекисью водорода H_2O_2), этиловым спиртом, концентрированными кислотами, щелочами, солнечным светом.

Химический состав яда обуславливает его токсикологические, фармакологические и другие свойства. В яде содержится 30 – 45% сухих веществ, в состав которых входят углерод, водород, азот, сера, фосфор, магний, кальций и другие элементы. Яд не содержит натрия и калия, наиболее распространенных физиологически активных ионов.

Из пчелиного яда выделены следующие фракции: 1) летучая, растворимая в эфире; 2) липоидная; 3) гистамин и органические кислоты; 4) минеральная; 5) белковая. С помощью хроматографии и электрофореза удалось разделить белковую фракцию яда и выделить основные полипептиды. В яде пчел содержатся ферменты, которые рассматриваются как агенты, повреждающие тканевые структуры. В состав пчелиного яда входят биогенные амины и феромоны.

Среди аминов идентифицированы гистамин и серотонин, которые вызывают боль у млекопитающих, приводят к расширению просвета и увеличению проницаемости капилляров. Катехоламины, дофамин и норадреналин оказывают влияние на поведение и физиологию насекомых.

В летучей фракции яда помимо воды содержатся амиловый, изоамиловый, этиловый ацетаты; всего свыше 20 летучих составляющих, многие из которых идентифицированы. Эти летучие сложные эфиры вызывают сигнальную реакцию тревоги в пчелиной семье. В яде присутствуют около 20 феромонов тревоги, многие из них идентифицированы. Они высвобождаются при выдвижении пчелой жала, а также при оставлении жала в теле млекопитающих. Последнее приводит к массовому нападению пчел на место, где оставлено жало.

Пчелиный яд хорошо растворяется в воде, физиологическом растворе, кислотах, растворим в растительных маслах, не растворяется в абсолютном спирте. Растворы яда не стойки, быстро подвергаются бактериальному заражению и распаду.

Примерный состав сухих веществ пчелиного яда по В.Г. Чудакову (1979) следующий (в % к сухой массе): пептид мелиттин – 40-50, пептид апамин – 3,4-5,1; прочие пептиды – до 16; фермент гиалуронидаза – 20; фермент фосфолипаза А – 14; аминокислоты – до 1; гистамин – 0,5-1,7; жиры и стерины – до 5; глюкоза – 0,5; фруктоза – 0,9; органические кислоты – 0,4-1,4 г-экв/л; прочие компоненты 4-10 %. Минеральные вещества (3-4 %) представлены Са, К, Р, Fe, Zn, Cu, S, больше других в пчелином яде обнаружено Mg.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ ЯДА

Фермент гиалуронидаза это гликопротеин, содержание которого в сухом яде колеблется от 2 до 3%. Фермент способствует проникновению яда в организм, так как увеличивает проницаемость клеток кровеносных капилляров, ускоряет расщепление гиалуроновой кислоты оболочек клеток, что ведет к снижению сопротивляемости организма к инфекциям.

Фермент фосфолипаза A_2 активен в отношении структурных фосфолипидов, которые входят в состав мембран, он ускоряет реакцию отщепления одного остатка жирной кислоты в молекулах фосфолипидов (лецитинов). В результате образуется токсичное вещество – лизолецитин, который вызывает гемолиз (разрушение эритроцитов), повреждает мембраны клеток и клеточных органелл, разрушает факторы свертывания крови, в состав которых входят фосфолипиды. Действуя на мембраны митохондрий,

лизолецитин нарушает клеточное дыхание. Фосфолипаза A_2 усиливает воспалительный процесс, вызываемый ядом.

Фермент лизофосфолипаза или фосфолипаза В расщепляет лизолецитин и этим уменьшает токсичность фосфолипазы A_2 его активность проявляется при $pH = 7.5$ и температурном оптимуме $39^\circ C$. А температурный оптимум фосфолипазы A_2 энзима более высокий и составляет $60-65^\circ C$.

Эти ферменты рассматриваются как антигены и вызывают у чувствительных людей аллергию к яду пчел.

Пептид мелиттин считается основным физиологически активным компонентом пчелиного яда: в больших дозах вызывает гемолиз и спазм гладких мышц кровеносных сосудов и внутренних органов. Обладает противомикробным действием. Усиливает выработку гормонов гипофиза и надпочечных желез – кортизола и кортизона, действие которых оказывает противовоспалительный эффект. За счет этого лечат ревматизм и полиартрит малыми дозами яда ($0,05-2$ мкг/мл). Мелиттин повышает устойчивость теплокровных к рентгеновским лучам. В больших дозах ($4-6$ мг/кг) угнетает центральную нервную систему, работу сердца, вызывает смерть.

Синтезированный мелиттин обладает теми же свойствами, как и натуральный.

Пептид апамин усиливает возбуждение и угнетает торможение нервных импульсов, может вызывать судороги. Увеличивает функцию надпочечников, повышает содержание биогенных аминов, адреналина, кортизола, кортизона. Повышает кровяное давление.

Оба пептида подавляют иммунную систему. Обладают противовоспалительным действием. Кроме этих пептидов, обнаружены пептид 401 (МСД-пептид), серотонин, адолапин. Пептид адолапин – единственный, который оказывает болеутоляющее действие.

Пчелиный яд обладает нейротропными свойствами, блокируя передачу возбуждения в симпатических ганглиях вегетативной нервной системы и затрудняя передачу через спинной мозг.

Малые дозы яда стимулируют изолированное сердце, токсические – угнетают, вызывая нарушения сердечного ритма, проводимости возбуждения в сердце.

Пчелиный яд обладает гемолитическим действием.

Лечебное действие яда основано на его воздействии на систему гипофиз-надпочечники. Под влиянием тропных гормонов гипофиза в кровь выделяются гормоны желез-мишеней, что обеспечивает нормализацию обменных процессов, повышается сопротивляемость организма.

Воздействие пчелиного яда на человеческий организм строго индивидуально. Аллергическая реакция возникает у большинства людей после 1-2 ужалений. Аллергические реакции это реакции немедленного типа, они возникают в течение 1 - 2-х или в первые 5 часов после ужаления. По степени тяжести они делятся на легкие, средней тяжести и тяжелые. Легкая аллергическая реакция проявляется в образовании отека на месте ужаления, который держится в течение 7 - 10 дней. Температура поднимается до $38^\circ C$,

появляется зуд, крапивница, отеки на лице - все это держится несколько часов, затем проходит самостоятельно. Аллергическая реакция средней тяжести сопровождается следующими симптомами: спазм гладкой мускулатуры внутренних органов, боли в животе, понос, рвота, боли в пояснице, затруднено дыхание, приступы удушья с затрудненным свистящим выдохом, сильная слабость, пульсирующая головная боль, кратковременная потеря сознания. Тяжелая аллергическая реакция может последовать за проявлениями реакции легкой и средней степени или наступает стремительно через 3 - 5 минут после ужаления, когда наблюдается потеря сознания, судороги, непроизвольное мочеиспускание и дефекация, падение кровяного давления, состояние коллапса.

При ужалении 200-300 пчелами у человека возникает токсическая реакция. Летальный исход наблюдается при ужалении одновременно 500 пчелами из-за паралича дыхательного центра.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЕ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

Процесс получения пчелиного яда заключается в том или ином способе раздражения пчел, в результате которого пчела эякулирует яд. Существующие в настоящее время способы раздражения подразделяются на механические и электрические.

Механическое раздражение пчел основано на прямом контакте какого-либо механического раздражения с телом пчелы. Одним из первых и наиболее трудоемких способов раздражения пчел является метод, описанный П. М. Комаровым и А. С. Эрштейном в 1936 г. Живые пчелы берутся пинцетом или пальцами, жало при этом высовывается наружу. Тонким глазным пинцетом оно слегка извлекается из камеры, после чего начинается автоматическое истечение яда. Если кончиком жала прикоснуться к поверхности стекла, то яд изливается на него и быстро высыхает, образуя застывшую каплю. На одно предметное стекло наносится яд от 50 – 100 пчел. Этим способом получается совершенно чистый яд, который может храниться неограниченно долго, не изменяя своих свойств.

Давно известен способ получения яда путем ужаления через тонкую жировую пластинку, предложенный Беком в 1935г. Берут широкогорлую стеклянную банку, наполняют ее до краев стерильной водой и обвязывают какой-либо животной пленкой (мочевой пузырь свиньи или пленка, снятая с мошонки барана). Пчел, охваченных пинцетом или пальцами, прикладывают к этой пленке, жало пронизывает ее и застревает, а яд непосредственно изливается в воду. Пчел удаляют, причем жалящий аппарат отрывается и остается на пленке. Этот способ, так же как и предыдущий, трудоемок и малопроизводителен. Преимущество метода заключается в том, что яд полностью извлекается и при этом ничем не загрязняется.

Известный немецкий исследователь животных ядов профессор Флури предложил несколько способов добывания пчелиного яда. Согласно одному

из них несколько пчел заставляют жалить волокнистую массу (например, размоченную фильтровальную бумагу). Жало остается в ней, а выделяющийся яд впитывается массой. Потом массу сушат и в таком виде хранят, а затем экстрагируют яд различными растворителями.

Флури предложил еще один способ получения яда. Значительное число пчел помещается в стеклянную банку, которая закрывается фильтровальной бумагой, смоченной эфиром. Пары эфира раздражают пчел и перед тем как впасть в состояние наркоза, пчелы выпускают яд, который остается на стенках банки и на телах пчел. Затем стенки сосуда и находящиеся в нем пчелы споласкиваются водой, которая растворяет пчелиный яд. Удалив сахаристые вещества диализом и выпарив воду, Флури получал от 1000 пчел 50 – 75 мг сухого вещества, содержащего сильно загрязненный яд.

Своеобразный прибор для отбора яда у пчел предложил Ноел в 1968 году. Предложенная им кювета-кормушка, хотя ее нельзя отнести к чисто механическим способам, свидетельствует о разнообразии подходов в решении проблемы получения ядовитого секрета пчел. Кювета-кормушка с лестничными перегородками наполнялась разбавленным медом, пропитывающим ткань губчатого типа. Улей устроен так, чтобы пчелы в одной половине улья испытывали некоторое недоедание. Побуждаемые запахом меда из кормушки, пчелы пробирались по специальному узкому ходу и попадали в ловушку. Возбужденные прилипанием к губке с медом пчелы выпускали в кювету яд, смешивающийся с медом.

На механическом раздражении пчел основано устройство, предложенное П. П. Соловьевым. Оно выполнено в виде располагаемых между рамками улья патронов с собирательной средой, приводимых во вращение для раздражения пчел и вызова массовых ужалений поверхности патронов. Патроны укреплялись на шестернях, смонтированных на пластине, установленной над рамками улья. Каждый патрон состоял из насаженного на стержень марлевого мешочка с впитывающей яд собирательной средой. Извлечение секрета из патронов осуществлялось с помощью центрифуги, выполненной в виде вращающегося диска с вертикально подвешенными к нему пробирками, в которые вставлялись патроны.

Электрическое раздражение пчел связано с соприкосновением тела пчелы с источником электрического тока. Авторами этого способа было показано, что оптимальным является импульсный ток, который, в отличие от постоянного и переменного тока, не вызывает массовой гибели пчел. Устройства для получения пчелиного яда состоят из 2-х главных узлов: источника раздражения (электростимулятор) и контактной токонесущей поверхности (ядоприемная кассета). Технология получения пчелиного яда, кроме непосредственного получения, включает в себя транспортировку ядоприемных кассет от лаборатории до улья и обратно, сушку яда на ядоприемных кассетах, ретушировку, счистку, просеивание и тарирование, химическую сушку и хранение яда.

Электростимулятор это прибор, предназначенный для электрического раздражения пчел с целью получения пчелиного яда. В разное время в

качестве раздражителя использовался постоянный или переменный ток промышленной частоты. В настоящее время общепринятым является использование импульсного тока, характеризующегося амплитудой колебаний, скважностью сигнала и модуляцией колебаний. Оптимальным считается следующий режим воздействия на пчел электрическим импульсным током: продолжительность импульса – 2 с, пауза – 3 с, амплитуда – 24-30 В, частота – 1000 Гц. Длительность паузы должна быть всегда больше, чем длительность импульса, что дает пчеле возможность уйти от повторного воздействия.

Одним из недостатков большинства моделей электростимуляторов является нестабильность выходного сигнала в связи с быстро изменяющейся нагрузкой, зависимой от количества пчел на электродной сетке. Этот недостаток сопровождается снижением ядопродуктивности пчелиной семьи, некачественным ядом и массовой гибелью пчел. Решить эту проблему удалось при создании модели электростимулятора ЭСС 4.1.

Продолжительность воздействия является одним из факторов, определяющих интенсивность раздражения, от которого зависит ядопродуктивность пчелиных семей. В первые три часа воздействия на пчелиные семьи импульсным током ядопродуктивность характеризуется высокими показателями. При увеличении времени воздействия количество яда увеличивается, но его прирост с каждым дополнительным часом раздражения уменьшается. При увеличении продолжительности воздействия более 4 – 5 часов резко увеличивается процент загрязненного яда.

Ядопродуктивность зависит не только от продолжительности воздействия импульсным током, но и от времени суток, в которое происходит раздражение. Максимальная ядопродуктивность отмечена при раздражении с 21.00 до 24.00 ($430 \pm 28,6$ мг). Показатели ядопродуктивности несколько ниже при электростимуляции пчел с 5.00 до 8.00 и с 18.00 до 21.00 часа. Таким образом, максимальная ядопродуктивность отмечена в утренние, вечерние и ночные часы, причем качество яда также варьирует в течение суток. При раздражении с 5.00 до 8.00 в образце содержалось 88% чистого яда, а с 14.00 до 17.00 только 28%. Подобное соотношение грязного и чистого яда вполне объяснимо с точки зрения биологии пчелы, так как в утренние часы пчела полностью переработала нектар, очистилась от пыльцы, отложила прополис, убрала погибших пчел. В дневное время, при массовом лете, пчелы нападают на токонесущие части ядоприемника, имея полный запас продуктов, необходимых для их жизнедеятельности.

Периодичность раздражения является одним из факторов, определяющих интенсивность раздражения, от которого зависит ядопродуктивность пчелиных семей. Максимальное снижение ядопродуктивности отмечается при постановке ядоприемников каждые 5 дней. В этом случае ядопродуктивность при первой и шестой постановке отличаются друг от друга почти в 5 раз. При периодической постановке через 10 дней ядопродуктивность так же снижается, но в меньшей степени. Оптимальным сроком повторной электростимуляции является 15 дней. при

такой периодичности ядопродуктивность не отличается друг от друга в течение 3-х месяцев.

Интенсивность раздражения при стабилизированных параметрах выходного сигнала составляет: амплитуда 30В, частота модуляции 1000 Гц, продолжительность пачки импульсов 1 с, продолжительность паузы 1 с. *Интенсивность раздражения* будет зависеть от количества ядоприемных кассет, установленных внутри гнезда, площади электродной сетки, продолжительности воздействия и периодичности раздражения.

Ядоприемная кассета, или *ядоприемник*, состоит из металлической пластины размером 400х285х3 мм, вставленной с длинной стороны в пазы стеклопластикового профилированного бруска размером: верхний – 470х14х14 мм, нижний – 400х14х14 мм. На основу при помощи специального станка наматывается нихромовый провод толщиной 0,4 мм с шагом 3 мм. Пространство между основной и электродной сеткой в рабочем состоянии заполняется пластиной полированного стекла размером 400х260х4 мм. Принципиальной особенностью ядоприемной кассеты является то, что электродная сетка в отсутствии пчел разомкнута. Пчела, попадая на ядоприемник, замыкает близлежащие электроды и подвергается воздействию импульсного тока, под действием которого жалит стекло, помещенное под электродной сеткой. Жало скользит по стеклу оставляя на нем капельки яда. Пчела остается живой, так как сохраняется анатомическая и физиологическая целостность жалоносного аппарата. Конструкция ядоприемной кассеты варьирует в зависимости от способа ее постановки, однако принципиальные особенности остаются во всех случаях одинаковыми.

Расчетная величина, полученная делением ядопродуктивности 1 пчелиной семьи (мг) на единицу площади электродной сетки (см²), называется *удельная ядопродуктивность* пчелиной семьи. Применяется для сравнительной характеристики устройств, имеющих разное количество ядоприемных кассет с одинаковой площадью электродной сетки, или одинаковое количество кассет, но с разной площадью электродной сетки.

Способы постановки ядоприемных кассет можно разделить на два вида: внеульевые и внутриульевые. Внеульевая постановка связана с каким-либо привлекающим пчел фактором, либо с негативным фактором, вызывающим раздражение пчел. Внутриульевый способ связан с прямым раздражением пчел внутри гнезда. Наиболее важным фактором при выборе способа постановки несомненно следует считать количество яда, которое можно получить от 1 пчелосемьи за 1 постановку.

К внутриульевому способу постановки ядоприемных кассет относятся подгнездовые конструкции. Постановка ядоприемных кассет размером 400Х300 мм осуществлялась непосредственно на дно улья. Электростимуляция производилась с 14.00 до 17.00 часов во время максимального лета пчел. И при такой постановке ядоприемника ядопродуктивность составляла лишь 23,3±4,2 мг. Ядопродуктивность пчелиных семей при одноматочном двухкорпусном содержании при постановке ядоприемников вразрез корпусов значительно выше и составляет

294±28,6 мг. Еще выше ядопродуктивность при двуматочном содержании и постановке ядоприемников вразрез корпусов.

Прилетковые конструкции – наиболее простой и менее трудоемкий, чем другие, способ постановки ядоприемных кассет. Сущность его состоит в следующем: на прилетную доску помещается ядоприемная кассета, соединенная с электростимулятором. Основным недостатком является незначительная ядопродуктивность (37,9±8,8 – 192,3±21,4 мг) и большой процент грязного яда, так как на электродную сетку попадают пчелы, идущие в улей с запасами нектара, прополиса, пыльцы.

Сотрудниками кафедры физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского был разработан способ и устройство, при котором пчелы выходят из улья в ответ на внешний раздражитель. Устройство включает в себя корпус улья, генератор электрических импульсов, ядоприемник и приспособление для создания электрогидравлического удара. Ядоприемник выполнен в виде двух шарнирно соединенных между собой рамок. На верхней рамке ядоприемника нанесен слой оптически неоднородной массы – нанесенный на полимерную пленку краситель в виде пятен. Верхняя рамка соединена с приспособлением для создания электрогидравлического удара. Приспособление состоит из генератора высоковольтного искрового разряда, включающего высоковольтный источник тока, конденсатор и искровой разрядник, камеру, заполненную жидкостью, в которую погружены электроды. Камера установлена на крышке улья. Нижняя рамка через электроды ядоприемника связана с генератором импульсного тока. Получение пчелиного яда осуществляется следующим образом. На электроды ядоприемника подается рабочее напряжение с генератора импульсов. Одновременно с включением генератора включают приспособление, которое на электродах, погруженных в жидкость, находящуюся в камере, формирует электрическую искру за счет высоковольтного источника тока, конденсатора и разрядника. При этом искра в жидкости через камеру действует на стенки корпуса улья, рамки ядоприемника и пчел. Для получения яда от пчел необходимо при энергии искры 12 Дж не менее 5 разрядов с интервалом 2 с. Механизм воздействия на пчел искрового разряда заключается в кратковременном взаимном механическом смещении всех конструктивных элементов, образующих устройство. Пчелы, испытывая воздействие гидравлического удара, выходят из корпуса улья через верхний и нижний летки в объем, образованный рамками и корпусом улья. Пчелы жалят электроды ядоприемника и выделяют яд на поверхность стекла в виде капель. Слой оптически неоднородной массы привлекает пчел на рамку, где они равномерно распределяются. Ядопродуктивность при таком способе постановки в течение 3-х часовой экспозиции составляла в среднем 52,8±9,1 мг пчелиного яда с 1 семьи за 1 постановку. Гибели пчел на электродной сетке не наблюдалось. Оценка биологической активности образцов яда, полученного при разных способах внеульевой постановки, показала, что по всем параметрам яд, полученный при помощи устройства с

электрогидравлическим ударом, обладает максимальной биологической активностью. Это связано с тем, что пчелы попадают на электродную сетку, выходя из улья и освободившись от пыльцы, прополиса, нектара, снижающих активность яда.

Одним из факторов, определяющих интенсивность раздражения, от которого зависит ядопродуктивность пчелиных семей, является площадь электродной сетки. Максимальное количество яда можно получить при помощи ядоприемника, имеющего площадь электродной сетки 1200 см^2 ($680,4 \pm 67,2 \text{ мг}$), а минимальное - при 400 см^2 ($225 \pm 28,4 \text{ мг}$). При площади электродной сетки 800 см^2 ядопродуктивность составляла $404 \pm 38,6 \text{ мг}$. Однако удельная ядопродуктивность во всех случаях была практически одинаковой ($0,1410 - 0,1417 \text{ мг/см}^2$).

Современная технология получения пчелиного яда на пасеках предполагает использование следующего оборудования: аккумулятор, электростимулятор, ядосборные рамки или кассеты, коммутатор, катушки проводов, контейнеры для транспортировки ядосборных рамок и стекол, сушилка для стекол с ядом, бокс и устройство для очистки яда.

Аккумулятор 12 В является источником питания, откуда электрический ток подается на преобразователь, генерирующий частоту импульсов $1,0 \pm 0,2 \text{ кГц}$. С выходной обмотки трансформатора через переключатель сигнал подается на ядосборные рамки. Работой преобразователя управляет схема запирающая, которая является электронным ключом, фиксирующим деятельность пачки импульсов и паузы. Принцип действия электростимуляторов основан на преобразовании постоянного тока в импульсный.

В настоящее время выпускаются различные электростимуляторы, отличающиеся своими характеристиками. Широко используются электростимуляторы «Вис-3» и «Пчелка» производства рижских кооперативов. Первый рассчитан на подключение 10 ядосборных рамок, второй – сорока. Серийное производство стимуляторов УЯС-1 налажено на опытном заводе «Лентеплоприбор» (г. Санкт-Петербург), «Апис-50» - на Новороссийском заводе «Прибой».

УЯС-1 имеет световую и звуковую сигнализацию наличия выходных импульсов (исправности прибора). Питание осуществляется как от аккумулятора, так и от сети. Устройство комплектуется блоками управления и ядосборными рамками от 1 до 5 штук. «Апис-50» рассчитан на подключение до 30 ядосборных рамок.

Первый отечественный серийный стимулятор с рамками-ядоприемниками серии «НИИХ ГГУ» демонстрировался сотрудниками кафедры физиологии Нижегородского государственного университета на Международном конгрессе по пчеловодству в 1971 г.

В настоящее время разработана технология «Сполох» (Ошевенский Л.В., Крылов В.Н., 1997), принцип работы которого основан на поиске оптимального раздражителя, провоцирующего пчел к ужалению без повреждения функциональных систем организма.

Диапазон частот электрораздражителя, вызывающих реакцию пчел без повреждения нервно-мышечной системы, составляет 200-5000 Гц, причем максимальная амплитуда может достигать 70-90 Вольт. Оптимальной амплитудой авторы считают 30 Вольт. При этом максимальная частота электродов (загрязняющихся прополисом) достигается при соотношении длительности импульсов к длительности пауз от 0,5:1,5 до 1:1. Важным моментом этой технологии является создание сигнала, отличающегося от периодического. Поэтому указанные частоты и амплитуда вырабатываются в стимуляторе по принципу «белого шума». Нарушение ритмичности сигнала при приближении его к сигналу шума приводит к увеличению производительности устройств для получения яда, при этом возбудимость пчел после стимуляции не изменяется.

В то же время возбудимость пчел при стимуляции периодическим сигналом возрастает через сутки при снижении непосредственно после стимуляции. Вероятно, это связано с неадекватным влиянием на центральную нервную систему насекомых и является причиной снижения медо- и пыльцепродуктивности при раздражении пчел стимуляторами периодических прямоугольных импульсов.

Для точного дозирования величины сигнала используется устройство «Сполох К», которое обеспечивает точную настройку любого электростимулятора с учетом состояния пчелиной семьи, температуры и влажности.

Устройство имеет вид линейки с электродами. Потенциал электродов линейно возрастает от одного ее конца к другому. Пчелы, пересекая линейку, получают удары тока разной величины, чем обеспечивается разное количество ужалений по длине индикатора. Информация с линейки считывается автографическим методом. Авторы установили, что яд, реагируя с фотоэмульсией, оставляет отпечаток в виде пятен с низкой оптической плотностью, пропорциональной его количеству на отрезках линейки-индикатора.

Ядосборные рамки по своим размерам соответствуют конструкции улья, но наиболее универсальны рамки 435 x 230 мм. В верхнем (470 мм) и нижнем (435 мм) брусках сечением 16 x 12 мм вырезают пазы (10 x 5 мм), в середине которых делают пропилов (5 x 2 мм). В пазы вставляют опорную пластину из алюминия, дюраля или стали толщиной 2 мм. Вокруг пластины через бруски натягивают в 2 ряда ни хромовую проволоку (0,3 мм), пропуская ее по поперечным пропилам обоих брусков, расположенным через 3 мм друг от друга. Всего помещается от 70 до 110 витков (около 60 м проволоки). На верхнем бруске закрепляют проволоку с одной стороны гвоздиками или болтиками, с другой – к проволоке крепят электрический изолированный провод с вилкой или специальным разъемом. По обе стороны от опорной пластины вдвигаются в рамку 2 стекла. Расстояние между стеклом и проволокой 0,4-0,6 мм, но не более 1 мм. Применяют специальные кассеты в виде надставок, оснащенные только электродами и стеклами без рамок. Electrodes из нихромовой проволоки натянуты попарно на

расстоянии 3 мм, а от плоскости ядосборных стекол – $1 \pm 0,1$ мм. В кассете один выход к электростимулятору. Наружные размеры кассет соответствуют размерам магазинов и устанавливают их как обычные магазинные надставки.

Пчелы, попадая на электроды ядосборных устройств, замыкают электрическую сеть, подвергаются слабому воздействию электрического тока и жалят, выдвигая жало в пространство между проволокой и стеклом. Яд выливается на поверхность стекла, образуя подтек, который высыхает за 10-15 минут.

Ядосборные стекла из шлифованного 3-х или 4-миллиметрового стекла предварительно моют поверхностно-активными веществами и стерилизуют 70 %-м этиловым спиртом. Ядосборные рамки со стерильными стеклами транспортируют в специальных контейнерах-кассетниках для постановки в улей.

Способы отбора яда различаются по месту размещения ядосборных устройств. Внутриульевой способ предполагает постановку ядосборных рамок вертикально внутри гнезда между сотами или горизонтально под расплодным корпусом, на пол улья, над сотами гнезда. Внеульевой способ с размещением ядосборных устройств около летка и на краю пасеки с использованием приманивающих пчел подкормок не получил распространения из-за малого количества получаемого яда, а также из-за загрязнения его примесями, снижающими качество продукта (пыльца и прочее).

Размещают рамки с 2 сторон расплодной части гнезда на расстоянии около 20 мм от ближайшего сота или на высоте 10 мм от брусков гнездовых рамок при отборе яда над гнездом. Рамки и кассеты ставят в гнездо непосредственно перед получением яда после окончания лета пчел или рано утром за 1 час до массового вылета пчел.

Максимально допустимое воздействие током – 3 часа (по 1 часу с перерывом 15 минут). Через 15-20 минут после электростимуляции ядосборные устройства вынимают без применения дыма и помещают в специальный контейнер для транспортировки.

Параметры раздражения пчел подбирают с учетом погодных условий (уменьшают напряжение на электродах с 30 до 24 В и частоту импульса с 1000 до 800 Гц при повышении влажности воздуха), а также породы пчел, их физиологического состояния, силы пчелиной семьи, количества ядосборных устройств в улье и их конструкции.

Яд отбирают от семей, имеющих не менее 10 улочек пчел и 6-7 сотов с расплодом, за 30-40 дней перед главным медосбором, не чаще 1 раза в 10-12 дней. Семьи не должны испытывать дефицит в белковом корме. Возможен однократный отбор яда сразу после медосбора. Обязательно наличие поддерживающего взятка в период отбора яда.

Не рекомендуется получать яд при высокой влажности воздуха (после дождя) и в холодный период. Для предотвращения гибели расплода из-за резкого повышения температуры в гнезде и для уменьшения выкучивания

пчел из улья на время отбора яда убирают из ульев утепление, увеличивают просветы верхних и нижнего летков.

Отобранные из улья ядосборные устройства переносят в лабораторию. Яд счищают лезвием бритвы или скребком в специальном застекленном боксе. При необходимости перед этим применяют принудительную сушку ядосборных устройств в камере с электротепловентилятором при температуре не более 40°C.

Сухой яд просеивают через капроновое сито (0,3 мм) в баночки из темного стекла с притертыми пробками, стерилизованные 70 %-м этиловым спиртом и маркированные этикеткой «Пчелиный яд сырец, масса ... г». Баночки хранят в эксикаторах (сухой яд гигроскопичен) при 15°C в течение суток, при – 20°C – более суток.

При всех операциях с пчелиным ядом избегают попадания на него солнечного света и контакта с ним работающих операторов. Обязательна защита слизистых и верхних дыхательных путей марлевой повязкой, респиратором и пылезащитными очками. Соскабливание, просеивание и фасовка пчелиного яда должны проводиться в стерильных ручных боксах.

Для перевозки ядоприемных кассет от пасеки до лаборатории, где происходят дальнейшие операции по обработке яда, используются *транспортные ящики*, которые могут быть двух типов: без выдвижного дна и с выдвижным дном. В первом случае ящик выполняет функции транспортировки ядоприемных кассет, во втором случае кроме транспортировки может быть использован при сушке пчелиного яда. Транспортный ящик представляет собой полый объем 900x80x360 мм, выполненный из 3-х мм фанеры с ребрами жесткости в местах соединения, снабженный герметичной крышкой и откидывающейся ручкой, обеспечивающей более компактную перевозку. Внутри имеются плечики, на которые вывешиваются ядоприемные кассеты (10 шт.).

Транспортные ящики для доставки кассет от пасеки до лаборатории могут использоваться только для транспортировки (ящик без выдвижного дна) или как для транспортировки так и для сушки (ящик выдвижным дном). Ящик с выдвижным дном, заполненный кассетами, помещают на открытый стеллаж под которым находятся тепловентеляторы, прогоняющие воздух между кассетами. Сушка яда таким способом повышают производительность, но снижает срок эксплуатации ядоприемных кассет. Сушка яда в термостатах при 40° С с вентиляцией воздуха производится путем извлечения стекол с ядом из ядоприемных кассет. Продолжительность сушки зависит от влажности яда и атмосферного воздуха.

После сушки проводят первичный процесс механического удаления со стекла ядоприемной кассеты видимых включений напыска нектара, включений прополиса, воска, экскрементов и отдельных частей погибших пчел, которые в основном остаются на электродной сетке, называется *ретушировка*. При ретушировке стекло кладут на лист белой бумаги, на которой более контрастно выделяются включения. Ретушировку производят глазным скальпелем, методично убирая включения.

Затем проводится *считка яда*. Считка яда заключается в соскабливании его с полированной поверхности стекла ядоприемной кассеты при помощи скребка. Скребок представляет собой зажимное устройство для фиксации лезвия безопасной бритвы. Практика показала, что для считки яда с одного стекла стандартного размера необходимо одно лезвие, причем задействуются обе его стороны.

Процесс очищения яда от микроскопических инородных включений, следующий за чисткой яда, заключается в просеивании яда. Яд *просеивается* через «мельничный газ», имеющий величину ячейки 0,1х0,1 мм, при помощи специального приспособления, выполненного из инертных пластических материалов. Устройство для просеивания состоит из одинаковых резервуаров: верхнего и нижнего, имеющих высоту 150 мм и диаметр 50 мм. В нижнем стакане имеется вырезка. Где помещается сито, фиксируемое сверху пазами верхнего резервуара. В нижний резервуар помещается пчелиный яд, в пазы вставляется сито и сверху фиксируется верхним резервуаром. Затем устройство переворачивается и помещается на площадку вибратора, которая совершает вертикальные колебания с частотой 50 Гц и амплитудой 1 мм. Кроме того, площадка поворачивается вокруг вертикальной оси со скоростью 1 оборот в секунду, причем после каждого оборота направление меняется на обратное.

После просеивания яд *тарირуется*: развешивается по 25 г в банки оранжевого стекла емкостью 100 мл, после чего подвергается химической сушке.

Химическая сушка – это удаление влаги из пчелиного яда химическим путем. После просеивания и тарирования яда открытые банки с ядом помещают в эксикатор, на дно которого помещается кристаллический хлорид кальция. Емкости с ядом находятся в эксикаторе 3 суток, после чего упаковывают банки для длительного хранения. Эксикатор представляет собой стеклянную круглую емкость различного диаметра. Нижняя часть эксикатора сужена, сюда помещается кристаллический хлорид кальция, который поглощает влагу. Верхняя часть эксикатора расширена. Между верхней и нижней частями помещается фарфоровая диафрагма с рядом отверстий. На диафрагму устанавливаются емкости с ядом. Сверху эксикатор закрывается притертой крышкой, соприкасающаяся часть которой смазывается вазелиновым маслом, для предупреждения попадания атмосферного воздуха внутрь эксикатора. Хлористый кальций – соль, в виде бесцветных кристаллов, которые поглощают воду, расплываясь в жидкость. Растворимость (г / 100 г воды): 74 при 20⁰С и 159 при 100⁰С. CaCl₂ образует гидрат CaCl₂ x 6H₂O, устойчивый до 29,8⁰С, при более высоких температурах из насыщенного раствора выпадают кристаллогидраты. Кальция хлорид применяют для высушивания газов и жидкостей.

Хранение яда определяется временем, в течение которого яд-сырец поступает на фармацевтический завод. Яд, подвергнутый химической сушке в банках из оранжевого стекла по 25 г в каждой, может потерять в массе до 10% своей первоначальной массы из-за потери влаги, что необходимо

учитывать при сдаче производителю лекарственных средств. Банки закрываются винтовыми пробками. Горлышко банки вместе с пробкой закрывается 6 слоями марли, которая нитками фиксируется на горлышке банки. Затем банка переворачивается вниз горлышком и опускается 2 – 3 раза в емкость с расплавленным воском. Далее наклеивается этикетка с указанием содержимого, его массы, времени и места сбора яда. Упакованный таким образом пчелиный яд может храниться в течение 20 лет без снижения уровня биологической активности.

Правила получения пчелиного яда на пасеках и его тестирования в лабораториях представлены в следующих нормативных документах: «Положение о работе на пасеках при производстве пчелиного яда», «Положение о работе с ядом в полевой лаборатории по тестированию», «Инструкция по технике безопасности работ с пчелиным ядом и хранение его образцов».

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

В настоящее время для стандартизации пчелиного яда пользуются в основном Фармакопейной статьей (ФС 42-26583-89 «Яд пчелиный»), разработанной сотрудниками кафедры физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского совместно с сотрудниками Рижского медицинского института.

Согласно требованиям ФС в образце яда потери в массе при высушивании не должны превышать 12%, нерастворимые в воде примеси – не более 10%, гемолитическая активность – не более 480 с, активность фосфолипазы A_2 – не менее 100 МЕ, активность глюкозамингликанового комплекса – не менее 70 мМЕ. Часто в практике стандартизации используют дополнительные методы оценки биологической активности яда.

Дополнительные методы оценки качества пчелиного яда отличаются от стандартных методов, предусмотренных Фармакопейной статьей (ФС 42-26583-89 "Яд пчелиный"). В одних случаях дополнительные методы оценки предназначены для экспресс-анализа качества яда, в других дают дополнительные сведения о биологической активности образца, кроме того могут являться не только методами оценки, но и способом фракционирования яда.

Для идентификации и количественного определения пчелиного яда, содержащегося в сырье используют экспресс-метод: гепариновую пробу. Суть метода состоит в том, что основное действующее начало - мелиттин может вступать во взаимодействие с гепарином, представляющим собой природный мукополисахарид и состоящий из глюкозамина, глюкуроновой кислоты и связанных с ними остатков серной кислоты. Взаимодействие гепарина с мелиттином осуществляется по стехиометрической схеме, причем оптимальными параметрами взаимодействия являются такие весовые соотношения: гепарин:мелиттин как 1:2. При взаимодействии гепарина с

мелиттином *in vitro* образуется высокомолекулярный комплекс, что значительно изменяет оптическую плотность раствора, причем оптическая плотность тем выше, чем выше концентрация мелиттина, а значит и пчелиного яда, в исследуемой жидкости. Практическое использование описанного эффекта возможно при простом сравнении исследуемого образца яда со стандартом. Для этого следует взять 3 мг пчелиного яда, соответствующего стандарта, растворить в 1 мл дистиллированной воды и добавить 1 мл раствора, содержащего 50 МЕ гепарина. Ампулу герметично запаивают. Затем 3 мг исследуемого образца помещаются в ампулу такого же объема, добавляют 1 мл дистиллированной воды и 1 мл раствора гепарина (50 МЕ/мл). Визуальным сравнением стандарта и исследуемого образца оценивается степень помутнения раствора. Если мутность тестового объема исследуемого вещества выше, то следует добавить дистиллированной воды до тех пор, пока растворы не сравняются по оптической плотности. Биологическая активность яда определяется по формуле: $B = (V_1/V_2) \cdot 100$, где B - биологическая активность образца; V_1 - объем раствора, содержащего образец; V_2 - объем стандартного раствора.

Качество пчелиного яда как исходного сырья для фармацевтической промышленности регламентируется как фармакопейной статьей ФС 42-2683-89, так и техническими условиями ТУ 46 РСФСР 67-72 «Яд пчелиный сырец».

Сухой пчелиный яд – порошок из чешуек и крупинок от серовато-желтого до бурого цвета, вызывающий раздражение слизистых оболочек, чихание. При высушивании потери яда в массе не должны быть более 12 %, нерастворимый в воде остаток – не более 13 %, гемолитическая активность – в пределах 60 с и фосфолипидная активность – до 8 мг.

Качество получаемого яда определяется породой пчел, силой семьи, сроками отбора, суточным приносом нектара, количеством и расположением ядосборных рамок или кассет, периодичностью электростимуляции. Наибольшее количество яда с максимальной гемолитической активностью можно получить от пчел среднерусской расы. Максимальная ядопродуктивность пчел и биологическая активность яда обеспечиваются при содержании сильных семей в условиях продолжительного пчеловодного сезона, при наличии постоянного поддерживающего взятка, при внутригнездовой постановке 2 ядосборных рамок или кассет между крайними медовыми сотами. Установка ядосборных кассет у летка, над или под гнездом, а также «тотальная электростимуляция» менее эффективны.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

Пчелиный яд состоит из различных компонентов, взаимодействующих друг с другом, что обуславливает разностороннее воздействие на многие биологические процессы живого организма. Наиболее изученным в настоящее время является эффект, проявляющийся при воздействии яда на нервную и сердечно-сосудистую системы, а также на систему крови. Первые

исследования пчелиного яда в России были выполнены в Горьковском госуниверситете профессором Н.М. Артемовым (Пчелиный яд: физиологические свойства и терапевтическое применение, 1941). Он выявил активизирующее влияние пчелиного яда на неспецифическую защиту организма путем воздействия на гипофизарно-надпочечную систему.

За счет многокомпонентного состава пчелиный яд используется при лечении широкого круга заболеваний. При лечении заболеваний используется как пчелоужаление, так и пчелиный яд, получаемый на пасеке.

В настоящее время накоплен большой опыт по использованию пчелиного яда. На его основе производятся лекарственные средства: апифор (таблетки для электрофореза); мази апизартрон, вирапин, апировен, меливенон; для подкожных инъекций – венapiолин, апитоксин, апикаин.

Препараты пчелиного яда снимают острые боли и воспалительные процессы при ревматоидном артрите, радикулите, используются при лечении ишиаса, воспалений тройничного и седалищного нервов, различных неврозов, оказывают тонизирующее действие на сердечную мышцу, понижают свертываемость крови, повышают содержание гемоглобина в крови.

В лечебных целях применяют препараты с различными ингредиентами пчелиного яда. Для промышленного получения чистых фракций компонентов пчелиного яда используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления.