МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и естественных наук	Кафедра "Общая биология и биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
на тему:

«ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФРАКЦИИ ПЕПТИДОВ МЁДА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 5-10 кДА»

Студент _____ Сергеева Ольга Сергеевна

Руководитель _____ Соловьев В. Б.

Нормоконтролёр _____ Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 13.06.17 №14)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 20.06.17 №13)

Секретарь ГЭК _____ Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 5

1.1 Лекарственные препараты пептидной структуры 5

1.2 Белки и пептиды мёда 10

1.3 Биологическая активность пчелиного меда 13

1.3.1 Иммуномодулирующая активность 14

1.3.2Антибактериальная и ранозаживляющая активность 17

1.3.3.Противовирусная активность 20

1.3.4.Анксиолитическая активность 20

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 23

2.1 Определение фруктозы реакцией Селиванова 23

2.2 Метод ультрафильтрации 24

2.3 Ионообменная хроматография 25

2.4 Оценка биологической активности 27

2.4.1 Открытое поле 27

2.4.2 Тест принудительного плавания 29

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 31

3.1 Расчет содержания пептидов искомой молекулярной массы 31

3.2 Очистка фракции пептидов 5-10 кДа методом ионообменной хроматографии 33

3.3 Оценка биологической активности препарата пептидов мёда с молекулярной массой 5-10 кДа 38

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 45

ВЫВОДЫ 46

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 47

ВВЕДЕНИЕ

Мёд — это нектар, собранный с цветковых растений и обработанный ферментами головных желез медоносных пчел. Этот натуральный продукт хорошо известен своей высокой питательной и профилактической лекарственной ценностью. Существуют данные, подтверждающие, что мёд обладает иммуномодулирующим, антибактериальным, антиоксидантным, анксиолитическим и т.д. эффектами. Уникальные биологические свойства мёда обусловлены компонентным составом. Широким спектром биологических эффектов обладают пептидные фракции.

Регуляторные пептиды являются универсальными эндогенными биологическими регуляторами клеточных функций в организме. Они являются частью сложнейшей системы специализированных сигнальных молекул, главной функцией которых является интеграция различных систем организма в единый функциональный комплекс. Исследования в области изучения биологических свойств веществ, входящих в состав пчелопродуктов, в том числе биологически активных регуляторных пептидов, возможно, позволят получить новые препараты самого разнообразного действия, в том числе препараты ноотропного, противовирусного и антибактериального действий и многие другие.

Большое количество факторов стресса различной интенсивности воздействуют на людей в современном обществе. Хронические стрессовые переживания приводят к развитию нейропсихиатрических расстройств, особенно тревожных расстройств и депрессии. В настоящее время анксиолитические лекарственные средства все чаще используются в клинической практике, в том числе на основе эндогенных регуляторных пептидов, которые обладают широким спектром активности и минимальными побочными эффектами и не вызывают зависимости и абстинентного синдрома. Мёд, в свою очередь, является богатым

источником физиологически активных природных соединений, таких как полифенолы и пептиды. Известно, что сырой мед обладает ноотропными эффектами, такими как усиление памяти, а также проявляет нейрофармакологическую активность [46,47]. Исследования показывают, что отдельные компоненты меда могут подавлять активные формы кислорода и противодействовать окислительному стрессу, восстанавливая антиоксидантные защиты [46].

На данном этапе применение пептидных препаратов ограничено экономическими причинами. Нюансы производства и сложность получения пептидов в промышленных количествах делают лекарственные средства на основе регуляторных пептидов чрезвычайно дорогими. Подсчитано, что лечение данной группой препаратов обходится бюджету в 100 долларов США в день. Мёд же, являясь широкодоступным продуктом, имеет большой потенциал в качестве сырья для нужд фармакологии и источника пептидов.

В этой связи поиск новых источников пептидов природного происхождения и изучение их биологических свойств является актуальной проблемой.

Целью работы является изучение физико-химических и биологических свойств фракции пептидов мёда с молекулярной массой 5-10 кДа. В этой связи были поставлены и выполнены следующие задачи:

1. Провести анализ литературы, указывающей на роль пептидов в фармакологии в целом и в лекарственных свойствах мёда в частности,
2. Разработать метод выделения фракции пептидов с молекулярной массой 5-10 кДа из раствора мёда,
3. Изучить биологическую активность выделенной фракции.

Бакалаврская работа написана на 53 листах, содержит 9 рисунков, 6 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 59 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лекарственные препараты пептидной структуры

Ещё до появления фармакологии как науки как таковой в лечебных целях использовались вытяжки из различных органов и тканей растений и животных. На данный момент достоверно известно, что многие препараты такого рода содержат активные действующие вещества белковой природы: сердце — пептид кардиалин, мозг — нейропептиды, кожа жаб — пептид бомбезин. Производство органопрепаратов — как они были названы — на основе биоматериалов крупного рогатого скота было налажено в XIX веке и прекращено во время Первой Мировой войны, однако до сих пор некоторые из них выпускаются и считаются весьма эффективными: кортексин (вытяжка из коры мозга), раверон (из предстательной железы), тималин (из тимуса), пантокрин (из пантов манала), рантарин и сайтарин (из рогов северного оленя и сайгака соответственно). Открытие пептидных гормонов и медиаторов можно считать началом новой науки — пептидологии. Пептиды с молекулярной массой до 10 кДа в достаточно малых концентрациях часто оказываются регуляторными агентами, способными проявлять биологическую активность. Короткие пептиды, в отличие от белков, невидоспецифичны и неиммуногенны, так как целиком представляют собой активную последовательность аминокислот, несущую информацию о физиологическом эффекте [16]. В экспериментах Хавинсона выяснилось, что короткие пептиды модулируют синтетическую способность в культурах клеток тех органов, из которых были выделены [11]. У млекопитающих они участвуют в координации и связи различных систем органов:

1. Пептиды — нейротрансмиттеры(субстанция Р), наряду со специфическими физико-химическими факторами, могут

вызывать деполяризацию мембраны нейронов (а так же железистых и мышечных клеток) и генерацию нервного импульса.

2. Специализированные клетки эндокринной системы выделяют в кровь гормоны, в качестве которых выступают и регуляторные пептиды (РП). Поступая с током крови к клеткам-мишеням, они вызывают ответные биохимические реакции посредством связывания с определенными рецепторами.(Ангиотензин)

3. В отличии от эндокринной паракринная система контролирует локальное клеточное окружение. Эта регуляция осуществляется выделением веществ — локальных медиаторов — алармонов, эйкозаноидов и пептидов.

4. При аутокринной регуляции и источником, и мишенью выделяемых регуляторных агентов является одна и та же клетка. Эта система играет важную роль на поздних этапах внутриутробного развития организма. Одновременный выход аутокринных сигнальных веществ обеспечивает дифференцировку клеток и переход сформированного органа на иной качественный уровень. (Пальцев, Иванов 1995)

В этой связи можно выделить несколько условных категорий пептидов, исходя из их биологических эффектов: пептидные гормоны; пептиды, регулирующие функционирование ЖКТ и аппетит; опиоидные пептиды-анальгетики; нейропептиды; антимикробные и иммуномодулирующие пептиды, тканеспецифичный пептидный фон.

Многообразие регуляторных систем опосредовано многообразием регуляторных и тканеспецифичных пептидов, получаемых клеткой в результате их выщепления из высокомолекулярных предшественников. Быстрое разрушение белковых макромолекул обеспечивается убиквитин-протеасомной системой. Убиквитин был впервые выделен из тимуса теленка и охарактеризован как пептид, влияющий на процессы

дифференцировки Т- и В-лимфоцитов [33]. Позже было обнаружено, что убиквитин одинаково распространен во всех клетках и тканях организма и его аминокислотная последовательность очень консервативна у эукариот. Вероятно, такая распространенность говорит о ключевой роли убиквитина в образовании пептидов в частности и поддержании клеточного гомеостаза и метаболизма в целом.

В 1941 году при обработке белков плазмы крови пепсином была получена смесь веществ, индуцировавших выход гистамина из тучных клеток (H. R. Croxatto, 1941). Дальнейшая работа позволила сделать вывод, что ферментативное расщепление отдельных белков приводит к образованию биоактивных пептидов, которые не соответствуют особенностям известных пептидных биорегуляторов. Большое количество «классических» регуляторных пептидов (РП) — таких как ангиотензин — высвобождается в результате отщепления от конкретных белковых предшественников, не выполняющих в организме иной роли, кроме как «производителя» необходимого пептида. Секретируемые пептиды далее взаимодействуют со специфическими рецепторами, локализованными на поверхности клеток-мишеней, и запускают трансдукцию сигнала в клетки. Таким образом реализуется активность большинства пептидных гормонов, парагормонов и нейротрансмиттеров, т.е. «классических» пептидных биорегуляторов. В отличие от них, новообнаруженная группа пептидов появлялась в результате протеолиза функциональных белков in vivo. В настоящее время известно, что при расщеплении гемоглобина, миелина, сывороточного альбумина, цитохрома с, лактоферрина высвобождаются физиологически активные фрагменты. Так, например, при протеолитической обработке гемоглобина была получена серия коротких аминокислотных последовательностей с опиоидно подобной активностью — геморфинов [37, 39].

Кроме пептидов с известными функциями в цитоплазме и межклеточной жидкости в больших количествах обнаруживались и другие.

Тканевые экстракты, используемые как источник РП, подверглись систематическим структурным исследованиям только в конце 1990-х годов прошлого века. Выяснилось, что на 1 г ткани приходится до 80 нмоль пептидов [37], что гораздо больше, чем содержание известных РП в большинстве тканей, а именно до 50 пмоль/г.

Долгое время считалось, что пептидный пул клетки — своеобразный биохимический «шум», мусор, который остается после разрушения функциональных белков. Однако последние данные свидетельствуют, что компоненты фона (пула) оказывают комплексное регуляторное воздействие на организм: отвечают за поддержание гомеостаза; деление, дифференцировку и апоптоз клеток [12, 19, 20]. Так, совместный прием эпирубицина с VV-геморфином-5 увеличивает количество выживших мышей со злокачественной опухолью молочной железы вдвое, останавливая клеточный рост, в отличие от приема одного эпирубицина [20], а фрагмент (2-32) α-глобина, наоборот, восстанавливает пролиферацию клеток красного костного мозга, предварительно обработанных эпирубицином, будучи неактивным в нормальных условиях [19]. Характер активности пептидов пула сильно зависит как от концентрации, так и от тонких структурных отличий: фрагмент α-глобина (1-33) незначительно уменьшает число опухолевых клеток, тогда как фрагменты (1-31), (1-32), (2-32) проявляют достоверную пролиферативную активность (~30%) [37]. Такие противоположные эффекты, вызываемые пептидами, полученными от одного фрагмента, можно рассматривать как своеобразный биохимический буфер. Известно, что некоторые патологии сопровождаются нарушениями состава тканеспецифичных пептидов в клетках. Независимо от своего характера эти заболевания вносят изменения в гомеостаз и метаболизм клетки (болезни Альцгеймера, Ходжкина). Нужно сказать, что понятие пептидного пула коррелирует с понятием цитомединов, предложенного для обозначения активных компонентов органопрепаратов. Возрастные заболевания,

предположительно, связаны с нарушением состава пептидного фона, а так же синтеза белков и пептидов. Прием пептидных препаратов в целях профилактики частично восстанавливал физиологические функции организма у людей и животных и достоверно увеличивал продолжительность жизни [4].

На основе аминокислотных последовательностей регуляторных пептидов, полученных из животных материалов, были синтезированы пептиды с малой молекулярной массой — цитогены — используемые в лекарственных целях (Тимоген). Исследования показали, что биологическая активность искусственных и натуральных пептидов идентична [14].

Несмотря на достоверные данные [11], указывающие на важные биологические функции, выполняемые пептидами, на фармакологическом рынке препараты на их основе представлены очень небольшим процентом(~1%). К ним относятся:

1. Органопрепараты
   - Специфического действия (Церебролизин, Кортексин, Раверон, Тималин)
   - Неспецифического действия (Актовегин, Сайтарин, Рантарин)
2. Препараты пептидных гормонов
   - Препараты гипоталамуса (Сермолерин (соматолиберин), Соматостатин, Протилерин (тиролиберин))
   - Препараты гипофиза (Кортикотропин, Гонадотропин, Интермедин)
   - Препараты паращитовидных желез (Кальцитрин (Кальцитонин))
   - Препараты поджелудочной железы (Препараты инсулина, Глюкагон)
3. Полусинтетические пептиды (Семакс, Дельтаран, Дисидипин)
4. Синтетические пептиды (Селанк, Ноопепт) [14]

В последние годы сильно возрос интерес к пептидам, обладающим нейропротекторным и антибиотическим действиями. Из них на сегодняшний день наибольшее распространение получили препараты-нейропротекторы. Это понятие объединяет лекарственные средства, способные защищать нервную ткань от агрессивных факторов внешней среды (стрессов, инфекций, токсинов) и/или уменьшать их воздействие на организм. С этих позиций множество препаратов можно отнести к данной группе: антиоксиданты, антигипоксанты, витамины, анксиолитики. Пептидные препараты используются в клинической практике относительно недавно и рассматриваются как перспективные нейропротекторы. Из них нужно отметить органопрепараты (Церебролизин, Кортексин), синтетические пептиды (Семакс, Селанк) и антитела к эндогенным веществам (Танотен). По результатам доклинических и клинических испытаний препаратов на основе регуляторных пептидов можно сказать, что пептиды безопасны и эффективны, а полученные из них лекарственные средства могут применяться для лечения пациентов с различными патологиями ЦНС, а также для профилактики этих заболеваний и снижения стресса у здоровых людей [13]. Однако, учитывая, что полный спектр биологической активности и механизмы действия пептидов до конца не изучены, можно предположить, что терапевтический потенциал данных препаратов ещё не исчерпан.

В этой связи очень важным и перспективным направлением является поиск и разработка лекарств на пептидной основе, так как биологически активные пептиды координируют практически все системы органов и участвуют в поддержании клеточного гомеостаза и иммунитета.

1.2 Белки и пептиды мёда

В 30-е годы прошлого века академик Филатов высказал мнение, что пчелиный мёд содержит биогенные стимуляторы, т. е. вещества,

повышающие жизнедеятельность организма. Мёд, как уникальный продукт животной и растительной природы, может включать компоненты различного генеза. Кроме основных сахаров — глюкозы и фруктозы — мёд содержит белки (0,25-0,5%), органические и аминокислоты, витамины и флавоноиды.

Высокой фармакологической активностью в продуктах пчеловодства обладают белки и пептиды. Некоторые белки мёда могут быть родом из нектара и пыльцы растений, однако большинство из них секретируются головными железами пчелы и поэтому имеют животное происхождение. Самыми изученными на данный момент являются MRJP-белки (major royal jelly proteins), которые были впервые выделены из маточного молочка, но затем найдены так же и в мёде. Исследования показали, что эти протеины составляют 90% всех белков мёда [55]. MRJP-белки обладают изученной биологической активностью: MRJP1 может способствовать регенерации печени и оказывать защитное действие на гепатоциты [52], а так же обеспечивает антибактериальные свойства мёда, MRJP3 может проявлять значительные иммунорегуляторные эффекты in vivo и in vitro [43], MRJP4 и MRJP5 являются важными источниками незаменимых аминокислот. Белки этого семейства являются гликопротеинами, вызывающими агглютинацию бактериальных клеток [22].

В структуре MRJP1 содержатся последовательности трёх антимикробных пептидов: джелеин-1, джелеин-2, джелеин-4. Противомикробные джелеины были первоначально получены из маточного молочка и, как подозревалось, высвобождались в результате процессинга белков семейства MRJP. Исследования, проведенные на синтетических джелеинах, показали их широкий спектр активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий и против дрожжей (в частности *C. Albicans*). Jellein-ы — это короткие пептиды, состоящие из 8-9 аминокислот, с общим суммарным зарядом +1 — +2. Последовательности джелеина-2 и джелеина-1 отличаются отсутствием

единственного остатка Thr в N-концевом положении джелеина-2, что, по-видимому, не играет существенной роли для антибиотической активности. Однако замещение остатка Thr остатком Glu в N-концевом положении вызывает значительное снижение антибиотического действия у джелеина-3. Удаление остатка Leu в С-концевом положении джелеина-4 приводило к полной потере антимикробного эффекта этого пептида [31]. Несмотря на то, что джелеины немного короче большинства известных антимикробных пептидов, они проявляют высокую противомикробную и противогрибковую активность. Механизм действия джелеинов против дрожжей и бактерий в настоящее время неизвестен. Дрожжи окружены в дополнение к плазматической мембране внешним барьером, который содержит в основном полисахаридные соединения. Таким образом, для обеспечения противогрибковой активности, необходимо пересечь этот углеводный барьер, чтобы достичь плазматической мембраны и взаимодействовать с нею.

Первичная последовательность джеллеинов не повторяет последовательности других антимикробных пептидов пчел (гименоптаецина, апидаецина, абаецина и дефензина). Тем не менее, исследователями было обнаружено высокое сходство джеллеина-2 с последними девятью аминокислотными остатками С-концевой области белка MRJP-1. Можно предположить, что этот пептид является продуктом протеолитического переваривания MRJP-1, который продуцируется в гипофарингеальных железах рабочей медоносной пчелы и секретируется в мёд. Действие экзопротеиназ либо на N-, либо на С-концевые положения данного белка может приводить к образованию джелеинов-1 и -4, соответственно. MRJP-1 является наиболее распространенным белковым компонентом мёда и играет важную роль в питании медоносной пчелы. В дополнение к этому, он может быть также формой предшественника антибактериальных пептидов.

Известно, что пчелы используют три типа эндопептидаз — трипсин, химотрипсин, эластазы — и экзопептидазу лейцинаминопептидазу в своём метаболизме. На основании литературных данных известно, что большинство протеолитических ферментов мёда представляют сериновые протеазы [59]. У пчел этот тип протеаз, помимо участия в процессах пищеварения, играет роль в формировании иммунного ответа [24]. Протеолитические ферменты меда могут значительно изменить профиль медового белка и тем самым сильно повлиять на качество и питательную ценность меда. Косвенную роль здесь играют цветочные субстраты. Известно, что в цветочной пыльце присутствуют протеазы [45], однако исследования белкового состава мёда не обнаруживают наличия белков растительного происхождения либо обнаруживают в незначительных количествах. Протеины нектара и пыльцы расщепляются в кишке пчелы до пептидов и аминокислот, но у различных видов растений эти продукты различаются по своему аминокислотному составу. В результате для протеолиза экспрессируются специфичные к каждому белку ферменты, определяющие общую протеолитическую активность и качество мёда. В частности, было показано наличие различных форм трипсина и химотрипсина для медов разных сортов [49].

Ферменты, участвующие в обмене углеводов давно известны. Это инвертазы (сахараза и α- глюкозидаза, которые катализируют превращение сахарозы и мальтозы в глюкозу и фруктозу), диастаза (амилаза, которая переваривает крахмал в мальтозу) и глюкозооксидаза (осуществляет превращение глюкозы до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода). Параметром качества мёда, установленным ГОСТом, является диастазное число, отражающее ферментативную активность мёда.

1.3 Биологическая активность пчелиного меда

Традиционное использование меда в народной медицине и современной науке объединено термином «апитерапия», который обозначает

применение меда и продуктов пчеловодства в качестве лекарственных средств. Апитерапия стала одним из основных направлений исследований, связанных с альтернативной медициной, поскольку широкий спектр известных профилактических или лечебных народных рецептов предлагает мед в качестве средства против различных заболеваний, а терапевтические свойства меда все чаще документируются в современной научной литературе.

1.3.1 Иммуномодулирующая активность

Со старинных времен мед считается одним из лучших натуральных продуктов, обладающим набором разнообразных полезных свойств. Эти свойства делают пчелиный мед не только источником питательных веществ, но и перспективным объектом исследования медицины и фармакологии. Среди них отмечается способность меда бороться с заболеваниями дыхательных путей, повышать общий иммунитет [2]. До недавних пор считалось, что мёд оказывает лишь общеукрепляющее действие на организм, способствуя этим борьбе с инфекциями [3]. Однако на данный момент имеются некоторые экспериментальные доказательства эффективности препаратов меда при ряде иммунных патологий. Так при потреблении группой пациентов (220 человек с содержанием лейкоцитов в крови ниже 4,5 тыс/мкл) 150 г меда в день в течение месяца было показано значительное повышение количества лейкоцитов и их способности фагоцитировать болезнетворные бактерии [5]. При добавлении 10% раствора мёда в рацион цыплят-бройлеров, ранее зараженных вирусом болезни Ньюкасла, исследователи добились увеличения массы лимфоидных тканей организма, а также титра антител цыплят [36].

Иммуномодулирующая активность пчелиного мёда предположительно основана на наличии в нем физиологически активных пептидов, попадающих в продукт из организма пчелы. Ферменты, выделяемые слюнными железами пчелы, играют роль в переваривании нектара до мёда. Однако широкий пептидный спектр указывает на то, что

помимо ферментов, гидролизующих ди- и полисахариды, в мед выделяется или освобождается протеолитически пептидная фракция, которая может быть биологически активна.

Известно, что беспозвоночные животные, к которым относятся пчелы, лишены системы приобретенного иммунитета. В борьбе с инфекциями они могут полагаться лишь на врожденную защиту, которая является довольно действенной, учитывая небывалый успех беспозвоночных в эволюционной гонке. При контакте организма с инфекцией врожденный иммунитет отвечает синтезом антимикробных пептидов (АМП). Большинство из них характеризуется малой молекулярной массой и положительным суммарным зарядом [1,7]. Пептиды, представляющие простые структуры, не содержат сложных модифицированных фрагментов или редких аминокислот, часто секретируются гемолимфой, обеспечивая широкий спектр действия против бактерий и грибков. По мере изучения АМП было установлено, что помимо прямого антибиотического действия многие из них проявляют регуляторные иммуномодулирующие свойства [9, 56]. В частности, усиливают фагоцитоз [30], индуцируют дегрануляцию тучных клеток [42], модулируют дифференцировку дендритных клеток [27].

Мед также традиционно использовался в качестве перевязочных материалов на протяжении тысяч лет. В последнее время медолечение вновь обрело популярность в качестве вспомогательной терапии для ускорения заживления ран. В обзоре Molan 1998 приводятся убедительные данные, подтверждающие сокращение времени заживления ожогов и пролежней после использования медовой марли по сравнению с другими перевязками. Было проведено сравнение заживляющих свойств меда и полиуретановой пленки (в группе мёда заживление длилось в среднем 10,8 дней, а в полиуретановой группе — 15,3 дней), мёда и амниотической мембраны (в медовой группе наблюдалось заживление через 9,4 дней, а в амниотическая группе — через 17,5 дней), мёда и сульфадиазина серебра

(в группе мёда 87% излечивалось через 15 дней, а во второй группе только 10% излечивалось через 15 дней) и мёда и физиологического раствора (8,2 дней против 9,9 дней). Исследователи не указали на активный ингредиент, обеспечивающий очищение ран от инфекций и тем самым являющийся одним из факторов, ускоряющих заживление, в то время как более сотни веществ являются кандидатами на эту роль. Клинические эффекты мёда в этой области преимущественно объясняются его двумя основными свойствами: антибактериальным и иммуномодулирующим. Нормальное заживление ран - сложный процесс, при котором поврежденная ткань удаляется и постепенно заменяется соединительной тканью [29]. Этому способствует деятельность врожденных иммунных клеток, таких как нейтрофилы и макрофаги, которые мигрируют к месту ранения в ответ на повреждение тканей. Эти клетки способствуют обезвреживанию инфекции и удалению посторонних материалов и клеточного мусора путем фагоцитоза. В дополнение к их фагоцитарной роли макрофаги выделяют различные факторы роста и цитокины, которые играют важную роль в процессе заживления [32, 41]. Ряд данных свидетельствует о том, что мёд стимулирует выработку противовоспалительных цитокинов (в отношении ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-1 из иммунокомпетентных клеток [54]. Стимуляция моноцитов отмечается синтезом цитокинов, модулирующих деятельность всех типов клеток, вовлеченных в процесс регенерации тканей. Фактор некроза опухоли стимулирует ангиогенез, пролиферацию фибробластов и синтез ими простагландинов и коллагеназы [28]. ИЛ-6 является важнейшим медиатором воспаления, митогеном для кератиноцитов [50], стимулирует лейкоцитопоэз, пролиферацию и дифференцировку В- и Т-клеток. У человека снижение его уровня с возрастом мешает заживлению ран. ИЛ-1 продуцируется фибробластами, стимулирует высвобождение фактора роста кератиноцитов [26]. Так же ФНО индуцирует производство ИЛ-6 кератиноцитами, а ИЛ-6 индуцирует экспрессию рецепторов к факторам роста кератиноцитов. Все это указывает на важную взаимосвязь

между этими тремя цитокинами. Исследователи выяснили, что сахарный раствор не вызывает увеличения продукции цитокинов, на основе чего был сделан вывод, что регуляторное действие мёда не основано на углеводных компонентах. Механизмы, посредством которых мёд влияет на выделение противовоспалительных агентов и факторов роста из моноцитарных клеток, пока неизвестны, и это представляет собой область для дальнейшего изучения. В более поздних исследованиях было выяснено только то, что на стимуляцию выработки ФНО-альфа через TLR4 влияет компонент мёда массой 5,8 кДа [53], который вполне может быть регуляторным пептидом.

1.3.2 Антибактериальная и ранозаживляющая активность

Антибактериальные свойства мёда широко известны, но его использование на практике остается ограниченным, в основном из-за недостаточного понимания всех механизмов, посредством которых мёд убивает болезнетворные микроорганизмы. Глобальная проблема постоянного роста устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам возродила интерес к клиническому использованию мёда, особенно в лечении ран, и к его способности бороться с лекарственно-резистентными патогенами. Серия независимых исследований показывает эффективность мёда при заживлении ран и язв и подавлении размножения инфекции независимо от типа повреждения и резистентности возбудителя к антибиотикам [10, 34, 48]. Разведение меда в жидком бульоне на 30-50% ингибирует рост различных патогенных бактерий, а также Candida albicans. Отечественными учёными была установлена высокая антибактериальная активность нативного мёда и зарубежных медовых препаратов на основе мёда manuka, особенно в отношении грамположительной флоры [10]. Подобные результаты были получены и за рубежом. Падевый, каштановый и полифлорный меда продемонстрировали значительное бактериостатическое и бактерицидное действие на грамположительные

бактерии, сравнимое с действием мёда manuka, тогда как антимикробная активность тестируемых медов была менее выраженной против грамотрицательных P. aeruginosa и P. mirabilis, чем E. coli. В частности, антибактериальное действие медов против P. aeruginosa было в основном бактериостатическим [34].

Противомикробный эффект мёда зависит от растения-источника; условий обработки и хранения мёда; преобладающих условий окружающей среды, влияющих на физиологию цветочных видов; связанных с пчелами факторов, таких как возраст или здоровье колонии, а так же от концентрации: при более сильных разведениях раствор мёда останавливает размножение, но не убивает бактерии, тогда как нативный мёд обладает выраженным антибиотическим действием [25]. Были предложены различные гипотезы, объясняющие антибактериальные свойства мёда. Содержание сахара в продукте достаточно высоко, чтобы препятствовать росту микробов. Этот фактор, как полагают, обеспечивает его осмотический эффект, что означает способность мёда обезвоживать бактерии. В результате останавливается размножение патогена и, следовательно, облегчается заживление. Антибактериальная активность также объясняется наличием перекиси водорода, которая непрерывно продуцируется ферментом глюкозооксидазой даже при разведении меда. Однако ни сахара, ни перекись водорода, по-видимому, не являются единственными веществами, которые служат причиной высокой эффективности мёда против бактериальных инфекций. Сравнительные исследования натурального липового мёда и мёда, полученного экспресс-методом из сахарозы, показали, что искусственный мёд обладает точно такими же антибактериальными характеристиками, что и контрольный липовый [3]. Это позволило сделать вывод, что противомикробные вещества в мёде — результат секреторной активности слюнных желез рабочих пчел.

Во время сбора пыльцы и нектара с растений медоносные пчелы становятся в большой степени подвержены заражению микроорганизмами, ассоциированными с медоносами. Для предотвращения инфицирования у пчел существует сложное взаимодействие врожденных и клеточных иммунных реакций как в тканях, так и в гемоцеле. Основной гуморальной реакцией организма пчелы на патоген является синтез антибактериальных пептидов, активных как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, причем эффективность АМП выше относительно первых. Как было указано ранее, мёд проявляет точно такое же существенно более выраженное действие на грамположительные бактерии, что и АМП пчел. Исследователи отмечают то, что для ингибирования жизнедеятельности грамотрицательной флоры требовалось повышение концентрации медового раствора в 2-4 раза [10, 48]. Эти данные дают все основания полагать, что в качестве основного антибактериального фактора в мёде выступают АМП, происходящие из организма пчелы.

На данный момент достоверно известно, что в ответ на инфицирование пчела выделяет четыре типа АМП, апидацин, абецин и гименоптаецин и дефенсины 1 и 2, которые непосредственно взаимодействуют с плазматической мембраной клетки патогена и нарушают её структуру, что ведет к гибели микроорганизма. Антимикробные пептиды насекомых синтезируются преимущественно клетками жирового тела и в небольшом количестве гемоцитами и оттуда с током гемолимфы поступают к месту заражения. Однако методом ПЦР в реальном времени было показано, что, по крайней мере, дефензины продуцируются также головными гипофаренгиальными и мандибулярными железами и поступают в мёд (Kwakman et al., 2010).

1.3.3 Противовирусная активность

Существует только одно опубликованное исследование Аль-Вайли et al, касающееся использования мёда взрослыми пациентами в борьбе с рецидивирующими приступами герпетических поражений (губным и генитальным). Местное применение меда сравнивали с лечением ацикловиром. Все пациенты, использовавшие мёд, показали лучшие результаты без побочных эффектов, по сравнению с пациентами из группы ацикловира, которые сообщали о зуде. Исследование показало, что местное применение мёда было эффективным в лечении боли и других признаков и симптомов рецидивирующих поражений генитальным и губным герпесом [18]. Эффективность мёда в данном случае может быть объяснена предотвращением вторичных бактериальных инфекций кожи, а также ускорением заживления герпетических поражений, однако есть некоторые сведения относительно противовирусных свойств мёда.

При сравнении экстракта чабреца и раствора мёда на предмет ингибирования вирусной активности было обнаружено значительное различие в их эффективности [58]. Результаты показали, что мёд оказал выраженное действие против вируса краснухи, не убивая и не повреждая инфицированные клетки, в то время как экстракт тимьяна не проявил значимого эффекта.

1.3.4 Анксиолитическая активность

В настоящее время ведется активная работа по изучению нейрофармакологических эффектов мёда. Его применение снижает тревожность и оказывает возбуждающее действие на нервную систему. Крысы, которым в течение года давали мёд как добавку к обычному рациону, проявляли меньшее беспокойство и показывали лучшую пространственную память и способность к распознаванию объектов, чем контрольная группа [46, 47]. В другом исследовании Oyekunle et al вводили крысам различные концентрации мёда (10%, 20% и 40%) в дозе 0,5 мл /

100 г. Значительные увеличения исследовательской активности в тесте «Открытое поле» были обнаружены у крыс опытных групп, по сравнению с крысами контрольной группы, получавшими сахарозу. Причем наиболее выраженный анксиолитический эффект наблюдался у животных, получавших более высокие дозы мёда.

Исследования, проведенные в 2010 г., проследили тесную взаимосвязь между окислительным стрессом и тревогой у пациентов, страдающих от тревожных расстройств (обсессивно-компульсивное расстройство и панические расстройства), а также у людей и животных, проявляющих высокое эмоциональное беспокойство [21]. Окислительный стресс — это повреждение клеточных макромолекул в результате дисбаланса между накоплением активных форм кислорода (АФК) и понижением способности клетки им противостоять. Особый интерес вызывает участие окислительного стресса в нейродегенеративных и психических расстройствах, включая тревожность, так как мозг считается органом особенно чувствительным к окислительному повреждению. Мозг потребляет значительное количество кислорода и поэтому производит сравнительно большое количество свободных радикалов, имея при этом относительно скромные антиоксидантные защиты. Кроме того, мозг богат липидными субстратами для окисления, а также ионами железа и меди, которые катализируют свободнорадикальные реакции [35].

Исследования показали, что как краткосрочные, так и долгосрочные добавки мёда в количестве 250 мг на кг массы тела в диету крыс серии Вистар значительно уменьшали перекисное окисление липидов в мозговой ткани с одновременным увеличением активности супероксиддисмутазы (SOD) и глутатионредуктазы [46]. Таким образом, потребление мёда повышает эффективность защитных механизмов против окислительного стресса и разрушения макромолекул, опосредованного свободными радикалами.

Предполагается, что антиоксидантный эффект мёда обеспечивается наличием флавоноидов — фенольных соединений растительного происхождения, однако нельзя исключать синергическое взаимодействие нескольких компонентов, одними из которых могут являться пептиды. Известно, что окислительный стресс является одной из причин старения. В это время пептидные препараты, представляющие собой вытяжки из органов и тканей животных, активно противостоят процессам старения, частично восстанавливая функции пораженных систем [11]. На данный момент известны последовательности более ста пептидов, обладающих антиоксидантной активностью, полученных различными способами, в том числе ферментативным гидролизом функциональных белков [6].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала исследования использовали полифлёрный мёд, возрастом не старше года. Образец хранили, исключая контакт с прямыми солнечными лучами, в плотно закрытой посуде при комнатной температуре.

Для выделения пептидной фракции с молекулярной массой 5-10 кДа к 75% раствора мёда добавляли 10% раствор ТХУ (в соотношении 2:1), центрифугированли при 5000 об/мин в течение 30 минут, надосадочную жидкость пропускали через установку VivaFlow, очищали от углеводных компонентов с помощью методов ионообменной хроматографии.

Полученный раствор пептидов с молекулярной массой 5-10 кДа хранили в плотно закрытой таре в морозильной камере при температуре -20^{o}C, концентрировали с применением лабораторной лиофильной сушки VaCo2. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [40].

2.1 Определение фруктозы реакцией Селиванова

Содержание фруктозы определяли реакцией Селиванова на каждом этапе выделения пептидов из мёда.

Метод основан на образовании окрашенного комплекса оксиметилфурфурола, образующегося при нагревании кетогексоз, с резорцином.

Для получения пригодной для измерения концентрации фруктозы образец разводили водой в 1000 раз. Отбирали аликвоты по 0,5 мл, куда затем добавляли 0,5 мл 0,1% раствора резорцина в этаноле и 1,5 мл 30% соляной кислоты. Содержимое пробирок перемешивали и ставили на 8 минут на водяную баню, разогретую до 80 °C. После пробы охлаждали и измеряли оптическую плотность на КФК-3 при длине волны 490 нм против

контроля. Расчёт концентрации фруктозы в пробе проводили по калибровочному графику [15].

2.2 Метод ультрафильтрации

Для отделения пептидов от крупных белковых частиц и выделения необходимой пептидной фракции 5-10 кДа использовалась установка для ультрафильтрации VivaFlow, работающая на принципе тангенциального тока жидкости. Этот принцип позволяет добиться сравнительно высокой скорости процесса и эффекта концентрирования прошедших через мембрану частиц.

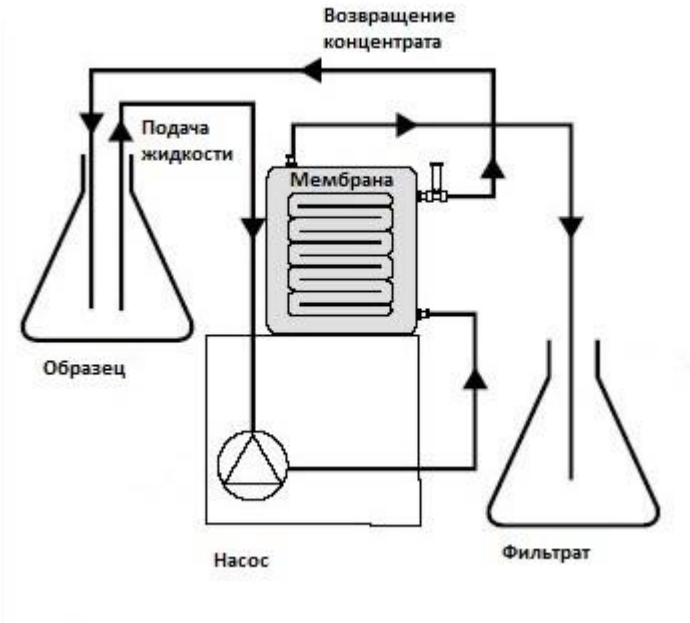

Рис. 1. Схема установки для ультрафильтрации VivaFlow

Установка VivaFlow представляет собой систему из перистальтического насоса с индикатором давления, многоразовой мембраны и емкости с концентрируемым раствором. Фильтрация и концентрирование происходят за счет создаваемого насосом давления, под действием которого жидкость поступает в полиэфирсульфоновую (ПЭС) мембрану со строго определенным размером пор. Мембраны из ПЭС более долговечны и устойчивы к механическим повреждениям. Они

выдерживают мощный напор жидкости и большие диапазоны pH (1-14). На такой мембране происходит разделение компонентов смеси в зависимости от диаметра пор и удаление потоком жидкости крупных соединений, не прошедших сквозь поры в постмембранное пространство, в резервуар для отходов. Из постмембранного пространства очищенные от примесей молекулы попадают обратно в емкость с исходным раствором.

Перед фильтрацией установку следует подготовить. Для этого необходимо пропустить через мембрану последовательно дистиллированную воду и 0,5 н NaOH для удаления оставшихся с прошлой работы адсорбированных крупных частиц. Резервуар для исходного раствора заполняют водой более чем на ¾ и после уменьшения объема наполовину меняют промывочную жидкость на 0,5 н NaOH для очистки от трудносмываемых загрязнений. Затем мембрану и шланги снова промывают дистиллированной водой.

Для отделения пептидов от высокомолекулярных белков и получения пептидной фракции 5-10 кДа ультрафильтрация проводилась в два этапа с использованием двух мембран с разными степенями разделения молекулярных масс. Для этого 250 мл 75% раствора меда помещали в специальный резервуар и подавали давление 2,5 бар (0,25МПа). Скорость фильтрации при этом составляла 200-300 мл/мин. При уменьшении объема исходного раствора до 50-100 мл скорость снижали до 20-40 мл/мин и продолжали прогон концентрата через мембрану в течение нескольких минут. После работы мембраны и трубки промыли как указано выше, высушили и убрали в холодильную камеру.

2.3 Ионообменная хроматография

Для очистки пептидов от углеводного пула использовался метод ионообменной хроматографии.

В качестве ионообменников применяли КМ-целлюлозу и ДЭАЭ-целлюлозу.

При подготовке ионообменника навеску порошка заливают дистиллированной водой, оставляют на 24 часа в темном, прохладном месте. Набухший ионообменник помещают в 0,5 н NaOH на 50-60 минут для удаления примесей, после чего осадок промывается водой до pH 7. На следующем этапе ионообменник обрабатывают 15-кратным объемом 0,5 н HCl и выдерживают 30-40 минут. Промывание водой продолжают до pH 5, так как дальнейшая промывка до нейтральных значений pH нецелесообразна из-за замещения контрионов ионообменника на OH^- и H^+ из воды и обратного закисления (для анионитов) или защелачивания (для катионитов) раствора. На последнем этапе осуществляют перевод ионогенных групп в нужную ионную форму, для этого аниониты обрабатывают 0,5 н NaOH, а катиониты — 0,5 н HCl как указано выше, с промывкой осадка дистиллированной водой до pH 7. В результате анионообменник оказывается в OH^--форме, а катионообменник — в H^+-форме, из которых легко переводятся в любую другую необходимую форму [8].

После забивки колонку уравновешивали буферным раствором 0,2 М Na-ацетатный, pH 4,2 для КМ-целлюлозы и 0,2 М Tris-HCl, pH 9 для ДЭАЭ-целлюлозы.

Образец наносили в объемах 400 мкл и 200 мкл, концентрация пептидов составила ~ 3мг/мл.

Для элюции пептидов с колонки и спользовали следующие буферные растворы:

- 0,2 М Tris-HCl, pH 9,0; 0,2 М цитратный буфер, pH 6,0 для КМ-целлюлозы
- 0,2 М Na-ацетатный буфер, pH 4,2; 0,2 М цитратный буфер, pH 6,0; 0,2 М Tris-HCl, pH 9,0 для ДЭАЭ-целлюлозы

2.4 Оценка биологической активности

2.4.1 Открытое поле

Одна из экспериментальных методик, которая наиболее часто используется в анализе тревожного поведения животных, - это тест открытое поле (Open Field Test). Разработанный Hall и Ballachey (1932), тест первоначально был предназначен для оценки двигательной и исследовательской активностей грызунов. Согласно приказу Минздрава России N 281 от 30.04.2013 оценка поведения крыс и мышей на установке «Открытое поле» входит в список исследований по изучению нейролептической, антидепрессантной и транквилизирующей (анксиолитической) активностей новых фармакологических препаратов. Открытое поле заключается в наблюдении за компонентами поведения животного после того, как оно будет выпущено в незнакомую для него среду. Роль таковой выполняет хорошо освещённая арена, в пределы которой животное никогда раньше не попадало и которая значительно превосходит по размерам его домашнюю клетку. Модифицированная версия открытого поля предусматривает добавление новых объектов на арену и количественное определение времени, которое животное затрачивает на посещение и изучение всех объектов.

2.4.1.1 Устройство установки для теста «Открытое поле»

Установка для открытого поля представляет собой хорошо освещенную круглую арену 1,5 м в диаметре, окружённую стенкой высотой 45 см. Арена разделена на сектора радиальными и круговыми линиями и имеет сквозные отверстия.

Выбор формы установки обусловлен психологией животных, так как поведение крысы в незнакомой среде будет сильно зависеть от условий этой среды, включая размеры пространства, наличие или отсутствие убежищ, достатка освещения и т.д. Углы в случае квадратного или

прямоугольного полей могут быть выбраны животным в качестве укромных мест, что будет влиять на ход эксперимента и приведет к загрублению результатов, особенно в случае небольших опытных групп. Поэтому наиболее оптимальной является круглая арена. Размеры арены так же могут влиять на погрешность исследования, так как и в случае слишком больших, и в случае слишком маленьких площадей наблюдаются слишком различные, не интерпретируемые типы поведения от «затаивания» до «гиперактивности», что обусловлено индивидуальными особенностями животных. Для получения относительно однородных результатов предпочтительно использовать арену средних размеров.

2.4.1.2 Оценка тревожного поведения

Под тревожностью понимается эмоциональный дискомфорт, вызванный ожиданием реальной или мнимой опасности. Новая среда активирует у животных сложный комплекс достаточно противоречивых поведенческих реакций: стремление исследовать новую территорию и стремление затаиться, вызванное вероятным наличием скрытых угроз. Соотношение осторожного и исследовательского поведений описывает состояние животного в открытом поле [38].

При помещении крыс в незнакомую потенциально опасную обстановку животные испытывают естественный страх. При этом начинает активно работать эвакуаторная функция кишечника. У «эмоциональных» крыс уровень дефекации и уринации повышен по сравнению с «неэмоциональными». Кроме числа фекальных масс, показателями поведения в ОП являются:

- горизонтальная активность в центре арены и у периферии,
- стойки на задних лапах,
- интерес к отверстиям на поверхности арены,
- фризинг – замирание без движения,

- груминг – гигиенические процедуры (умывание, вылизывание).

Отсутствие груминга, частая дефекация, редкие пересечения центральных секторов арены, длительные эпизоды фризинга говорят о тревожности животного [23].

Было показано, что введение анксиолитиков увеличивает время пребывания в центре открытого поля, в то время как стрессовые стимулы уменьшают количество посещений центра. Таким образом, активность в открытом поле представляет собой достоверный метод, позволяющий оценить заметные изменения в «тревожно-подобных» состояниях у животных, которым вводили лекарственные препараты. Процедура открытого поля может также использоваться для общей оценки локомоторной активности животных.

2.4.2 Тест принудительного плавания

Тест принудительного плавания (Forced Swim Test) является одной из наиболее часто используемых моделей для оценки поведения животных, подверженных терапии антидепрессантами. Эта модель включает в себя анализ активного и пассивного поведений грызунов, вынужденных плавать в тесном сосуде без возможности выбраться. Когда крысы подвергаются эксперименту, после начального активного поведения, направленного на побег, такого как плавание и лазание, животные прекращают попытки и впадают в пассивное неподвижное состояние. Неподвижность, как полагают, либо является одной из форм освобождения от стресса, либо отражает отказ бороться далее (то есть отчаяние) [23].

В отличие от оригинального поведенческого теста отчаяния, предусматривающего **две** посадки животного в узкий цилиндр с интервалом между ними в 24 часа, тест принудительного плавания, на который ссылаются как отечественные, так и зарубежные исследователи,

не имеет четких методических указаний по форме сосуда и уровню воды и предполагает только **одну** посадку.

Процесс регистрации показателей поведения проводится в виде непосредственного наблюдения за животными. В данном эксперименте использовалась методика видеофиксации, что позволило после его завершения оценить поведенческий акт более подробно и получить более полные результаты.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Расчет содержания пептидов искомой молекулярной массы

Количественную оценку содержания пептидной фракции в исследуемом меде делали при помощи индекса Ipe/pro (GMT), позволяющего охарактеризовать соотношение пептидов к общему количеству белка. Для этого рассчитывали концентрацию белковых веществ в сыром 75% растворе, после осаждения ТХУ и после очистки на VivaFlow. Расчет производили на 100 г мёда по калибровочному графику, сделанному по БСА (график 1).

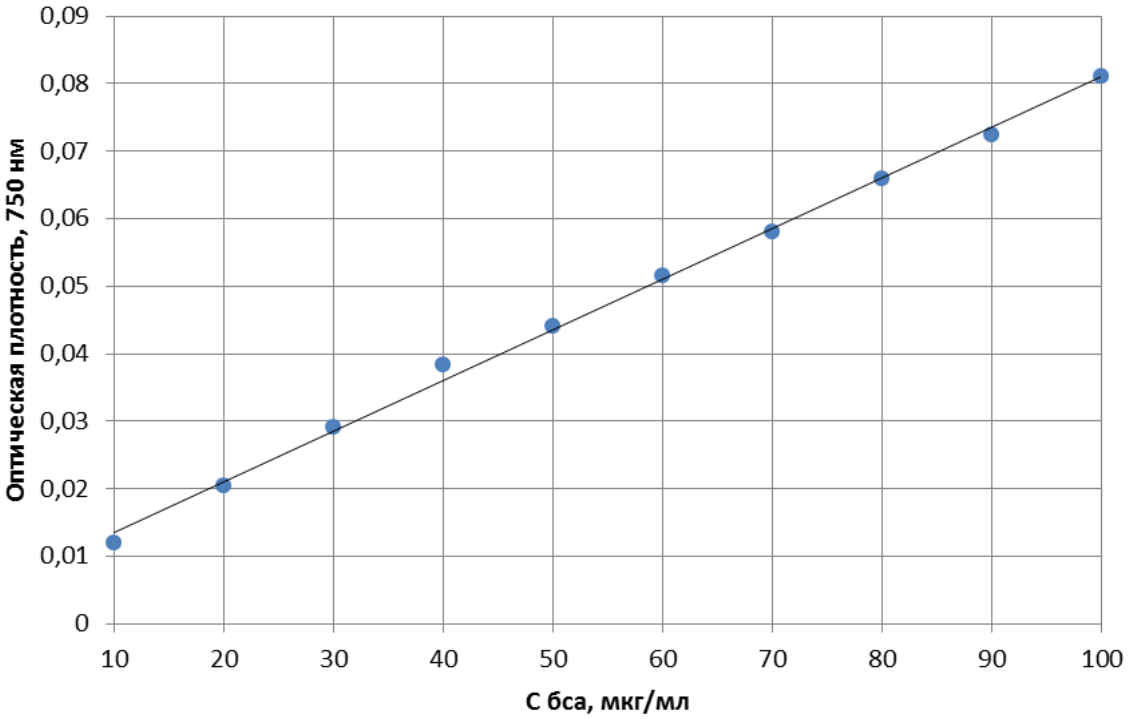

Рис.2 . Зависимость оптической плотности от концентрации БСА

Расчет содержания белков и пептидов можно представить на примере исходного раствора: установлено, что в 75% растворе мёда содержится 8,96 мг/мл белковых веществ. На 1 мл раствора приходится 0,75 г мёда. Отсюда на 100 г мёда приходится: (100 х 8,96)/0,75 = 1200 мг или 1,2 г белковых веществ. По этому же принципу рассчитывали

концентрацию общих пептидов и пептидов с интересующей молекулярной массой.

В таблицах 1, 2, 3 предоставлены результаты исследования:

Таблица 1.

Содержание компонентов спектра белковых веществ в 100 г мёда

Номер пробы	**Общее содержание белковых веществ, г**	**Общее содержание пептидов, г**	**Содержание пептидов 5-10 кДа, г**
1	1,18	0,59	0,30
2	1,20	0,62	0,33
3	1,13	0,54	0,27
4	0,98	0,46	0,22
5	1,22	0,65	0,36
Среднее значение	**1,14**	**0,57**	**0,29**
Стандартное отклонение	**0,09**	**0,07**	**0,05**

Таблица 2.

Отношение содержания искомой фракции к среднему содержанию белковых веществ

Среднее содержание белковых веществ, г	**Среднее содержание пептидов 5-10 кДа, г**	**Index Ipe/pro (GMT),%**
1,14±0,09	0,29±0,05	25,5±2,5

Таблица 3.

Отношение содержания искомой фракции к содержанию белковых веществ, не осаждаемых ТХУ

Среднее содержание пептидов, г	**Среднее содержание пептидов 5-10 кДа, г**	**Index Ipe/pro (GMT),%**
0,57±0,07	0,29±0,05	51±2,6

В таблицах 2,3 представлено количественное содержание фракции пептидов 5-10 кДа в спектре белковых веществ мёда. Из полученных данных видно, что пептиды 5-10 кДа составляют половину из всех пептидов мёда и примерно четверть всех белковых веществ. Количественное соотношение содержания пептидов к белкам и различных пептидных фракций друг к другу можно использовать в качестве маркера натуральности и качества мёда.

3.2 Очистка фракции пептидов 5-10 кДа методом ионообменной хроматографии

После фильтрации на VivaFlow на выходе получили отделённый от крупномолекулярных соединений раствор, содержащий пептидную фракцию, углеводные компоненты, пигменты и т.д. Для дальнейшей очистки пептидов был использован метод ионообменной хроматографии.

3.2.1 Очистка пептидов от углеводного пула на КМ- и ДЭАЭ-целлюлозах.

Раствор пептидов 5-10 кДа объемом 400 мкл и 200 мкл наносили на стеклянную колонку (1,5см*5см) и собирали 25 фракций по 1,5 мл. После сбора первых фракции меняли исходный буфер. Для катионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе:

- 1-8 фракции – элюция 0,2 М Na-ацетатным буфером, pH 4,2;
- 8-15 фракции – элюция 0,2 М цитратным буфером, pH 6;
- 15-25 фракции – элюция 0,2 М Tris-HCl, pH 9.

Позже от использования цитратного буфера отказались, т. к смывка им пептидов с ионообменнка оказалась неэффективной, а количество собираемых фракций уменьшили до 20.

Для анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе:

- 1-10 фракции – элюция 0,2 М Tris-HCl, pH 9;
- 10-25 фракции – элюция 0,2 М цитратным буфером, pH 6.

От полученных фракций отбирали аликвоты по 0,5 мл и определяли содержание пептидов методом Лоури и содержание фруктозы реакцией Селиванова.

Результаты представлены на рисунке 3:

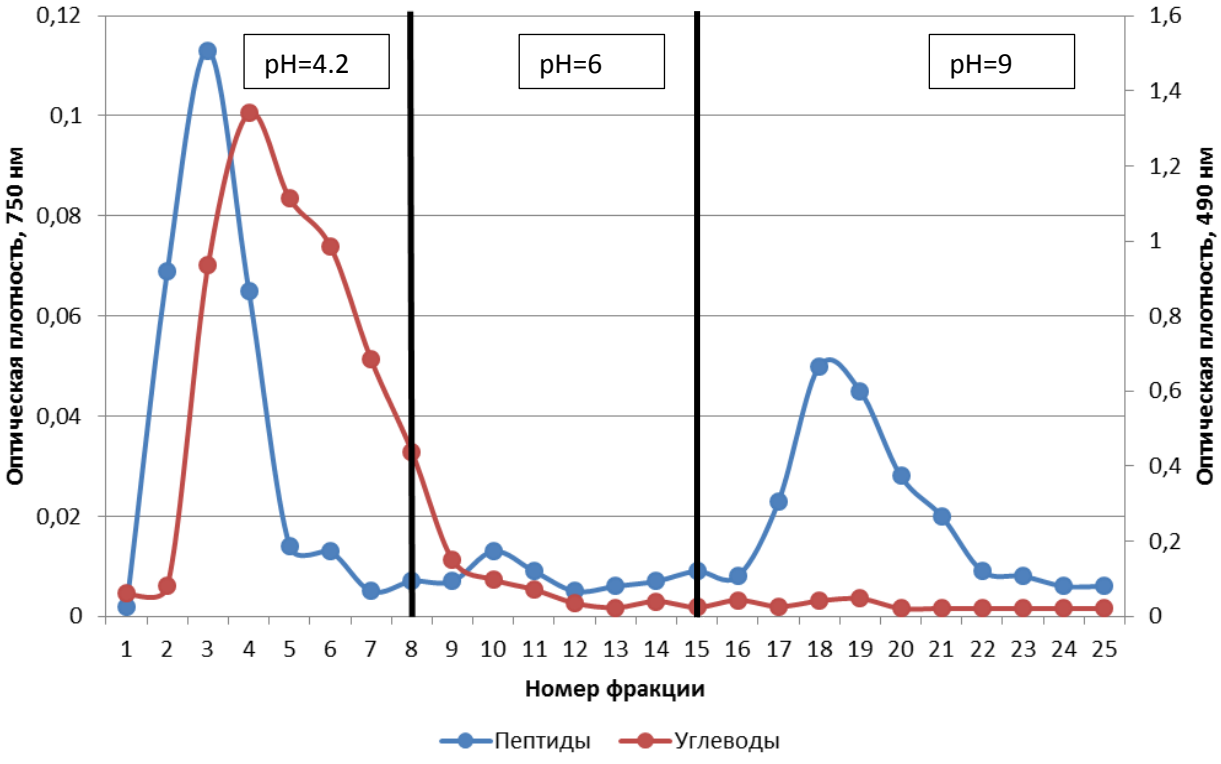

Рис. 3. Профили элюции углеводов и пептидов мёда на КМ-целлюлозе при элюировании Na-ацетатным буфером (pH 4,2); цитратным буфером (pH 6), Tris-HCl (pH 9)

Пептиды мёда представляют собой соединения, несущие в своей структуре ионогенные группы, представленные аминокислотными радикалами. Если пептид в большинстве содержит кислые аминокислоты (глутамат и аспартат), то при нейтральных значениях pH будет заряжен отрицательно с изоэлектрической точкой в кислой области. Если же в его составе преобладают основные аминокислоты (лизин и аргинин), то при нейтральных значениях пептид будет иметь суммарный положительный заряд и изоэлектрическую точку в щелочной области. Соответственно, заряд пептида во многом будет определяться двумя параметрами: аминокислотным составом и внешними факторами, включая pH раствора.

При ионообменной хроматографии особенно важно выбрать подходящий буфер, pH которого будет позволять пептидам адсорбироваться на матрице или десорбироваться с неё при ступенчатой элюции. В случае разделения пептидов мёда на КМ-целлюлозе цитратный буфер с pH 6 не подходит, так как, они, видимо, в основном представлены пептидами основного характера, с изоэлектрической точкой, сильно сдвинутой от нейтральных значений в щелочную сторону (рис. 5).

Из данных, представленных на рисунках 5,6 можно допустить, что разделение пептидов мёда на катионные и анионные носит преимущественно условный характер, определяемый способом получения. Пик 1 на рисунках 3,4 соответствующий фракциям 1-4, представлен пептидами, которые по некоторым причинам не адсорбировались на ионообменнике и вышли в свободном объеме колонки вместе с углеводами, пигментами и другими мелкими молекулами. При разделении на КМ-целлюлозе четко проявляется пик 2, соответствующий фракциям 17-21 на рисунке 3 и фракциям 12-15 на рисунках 4 и 5, представленный пептидами, связавшимися с матрицей и смытыми с неё после смены элюирующего буфера на Tris-HCl, pH 9. Углеводы не имеют заряда и поэтому выходят сразу в первых фракциях, не задерживаясь ни на катионитах, ни на анионитах. Среди причин, влияющих на степень

адсорбции, может быть недостаточно отработанная технология забивки колонки и наличие в ней пузырьков воздуха, экранирующих реакционноспособные группы. На эффективное связывание пептидов влияет и объем наносимого на колонку образца.

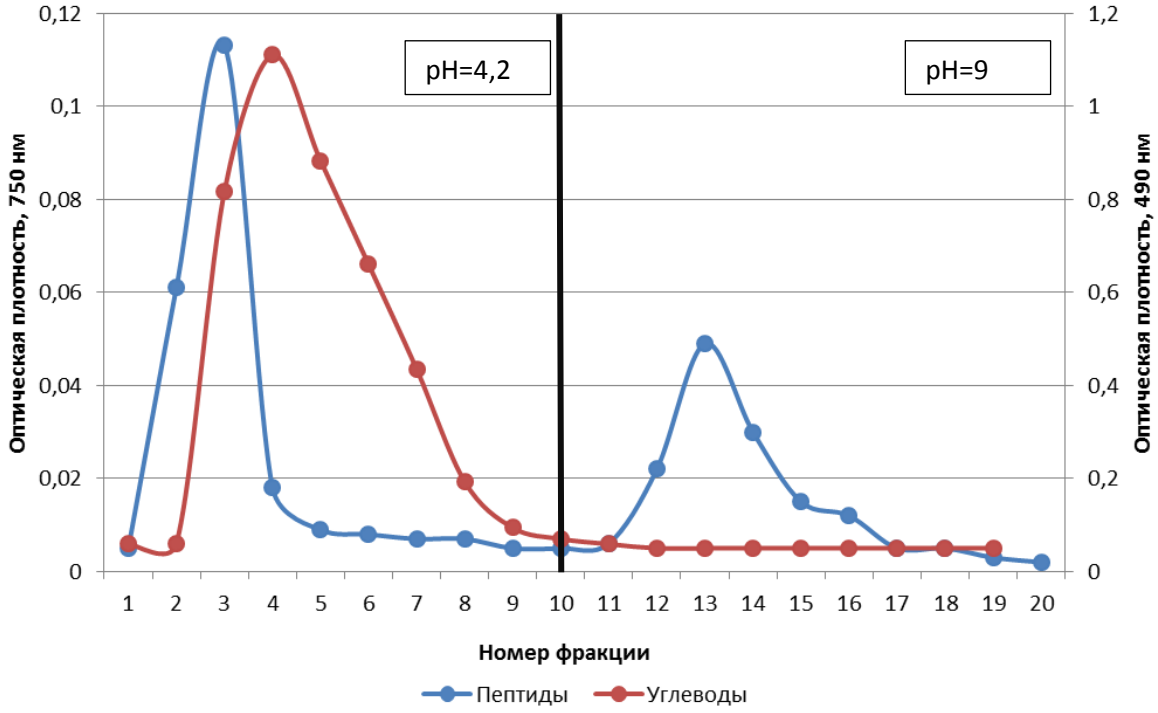

Рис. 4. Профили элюции углеводов и пептидов мёда на КМ-целлюлозе при элюировании Na-ацетатным буфером (pH 4,2); Tris-HCl (pH 9)

Опытным путём было обнаружено, что на степень связывания препарата и, как следствие, результаты хроматографии влияет объем наносимого на колонку препарата. На рис. 7 показаны профили элюции пептидов при нанесении на колонку с рабочим объемом 1,5*5 мл 400 мкл и 200 мкл раствора мёда, где второй пик представлен пептидами, вышедшими из колонки при смене pH буфера в щелочную область (соответствует пику 2 на рис. 6). Видно, что при увеличении объема образца до 400 мкл количественный выход падает почти вдвое по сравнению с пробой в 200 мкл, то есть наблюдается обратная зависимость между объемом образца и выходом пептидов в результате хроматографии.

Причиной является наличие в медовом растворе, полученном фильтрацией на VivaFlow, углеводов высокой концентрации, способных свободно проходить через поры мембраны. Молекулы сахаров препятствуют связыванию пептидов с ионитом, что приводит к их выходу в свободном объеме колонки.

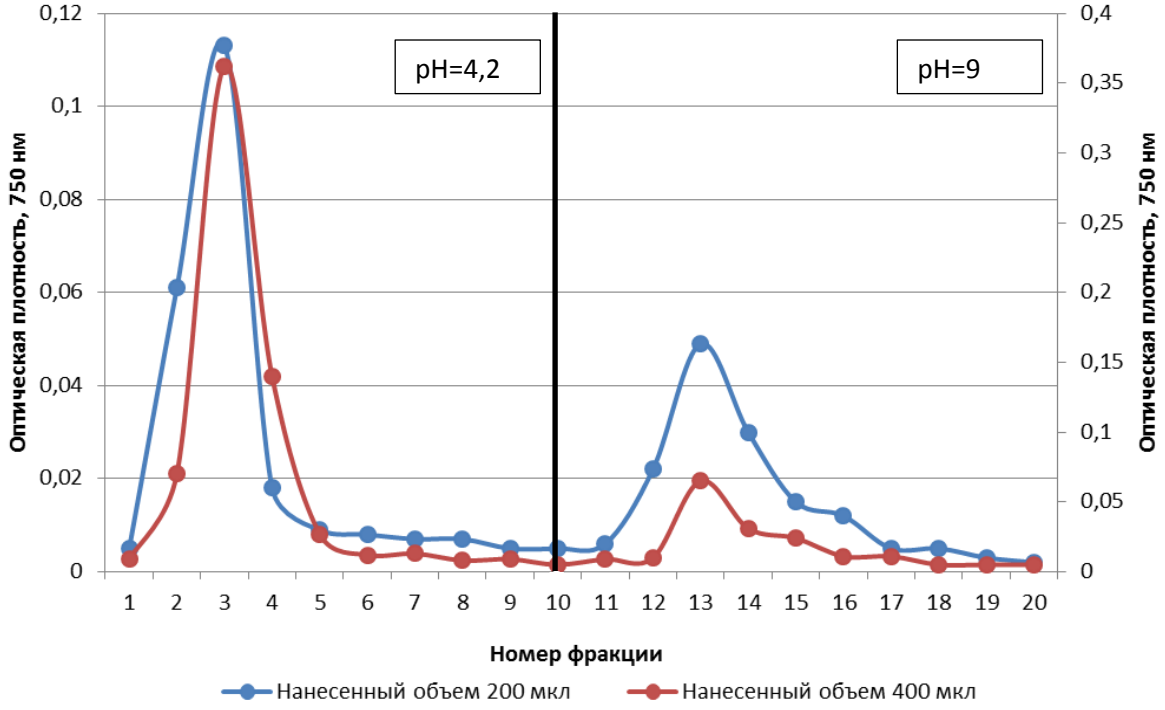

Рис. 5. Профили элюции углеводов и пептидов мёда на КМ-целлюлозе при элюировании Na-ацетатным буфером (pH 4,2); Tris-HCl (pH 9), объем нанесенной пробы 200 мкл и 400 мкл

Эти результаты во многом согласуются с тезисом, что фракция пептидов мёда 5-10 кДа включает пептиды-компоненты иммунной системы пчел из группы АМП, которые в физиологических условиях несут положительный заряд, необходимый для связывания с отрицательно заряженной бактериальной мембраной [44].

3.3 Оценка биологической активности препарата пептидов мёда с молекулярной массой 5-10 кДа

Методом ионообменной хроматографии был получен очищенный от углеводного компонента раствор пептидов, однако выделенный таким образом препарат все ещё непригоден для использования и требует дальнейшего концентрирования. Для этого его лиофилизировали до образования сухого остатка с использованием лиофильной сушки VaCo 2. В ходе процесса образцы замораживали при -80 °C в течение суток, затем сушили в вакуумной камере при комнатной температуре в течение 12 часов. Полученный остаток растворяли в 200 мкл воды. Концентрацию конечного препарата определяли спектрофотометрически. Она составила 1,5 мг/мл.

Для оценки биологической активности пептидов мёда 5-10 кДа была выбрана анксиолитическая активность, так как существуют литературные данные, подтверждающие наличие у мёда указанного свойства. В качестве экспериментальных животных использовались беспородные крысы одного пола и возраста, что обусловлено удобством в обращении и простотой проведения манипуляций.

3.3.1 Исследование анксиолитических свойств фракции пептидов мёда 5-10 кД

В целях получения более точной оценки влияния изучаемого препарата на поведение животных эксперимент проводили в двух тест-системах: «Вынужденное плавание» и «Открытое поле». Каждое испытание выполнялось на 15 белых крысах-самцах, разделенных на 3 группы: интактную, контрольную и опытную (таблица 3). Для определения разницы в биологическом эффекте и, соответственно, действующего компонента препарат пептидов мёда исследовали на разных стадиях очистки. В качестве положительного контроля был выбран пептидный

препарат «Селанк», обладающий выраженными стресспротекторными, ноотропными и анксиолитическими свойствами. Препараты вводили внутрибрюшинно за 30 минут до эксперимента в дозах, рекомендованных производителем препарата «Селанк» в пересчете на массу тела животных.

Таблица 4.

Схема эксперимента

	Испытание		**Вводимый препарат**
	Открытое поле	Вынужденное плавание	
Группа животных	Интактная N=5	Интактная N=5	0,02 мл физраствора
	Контрольная N=5	Контрольная N=5	0,02 мл препарата «Селанк» (0,15%)
	Опытная 1 N=5	Опытная 1 N=5	0,02 мл препарата пептидов после УФ (0,15%)
	Опытная 2 N=5	Опытная 2 N=5	0,02 мл мл препарата пептидов после ИОХ (0,15%)

Животных помещали в арену открытого поля/сосуд с водой и в течение 5 минут регистрировали показатели поведения на видеокамеру. Статистическую значимость результатов рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты влияния вводимых препаратов на исследуемые компоненты поведения показаны в таблицах 5,6.

Таблица 5.

Оценка влияния препаратов пептидов мёда и препарата «Селанк» на различные типы деятельности в тесте «Открытое поле»

	Селанк	**Препарат пептидов после УФ**	**Препапат пептидов после ИОХ**
ГДА	+	+	–
ВДА	+	+	–
Обнюхивание	+	–	–
Груминг	–	+	–
Дефекация	+	+	–
Фризинг	+	+	–
Примечание: Наличие эффекта - «+», отсутствие эффекта- «–»			

Таблица 6.

Оценка влияния препаратов пептидов мёда и препарата «Селанк» на различные типы деятельности в тесте «Вынужденное плавание»

	Селанк	**Препарат пептидов после УФ**	**Препарат пептидов после ИОХ**
Активное плавание, с	+	+	–
Пассивное плавание, с	–	–	–
Неподвижность, с	+	+	–
Примечание: Наличие эффекта - «+», отсутствие эффекта - «–»			

Результаты показали, что неочищенный многокомпонентный раствор пептидов, углеводов, фенолов и других низкомолекулярных веществ мёда оказывает ингибирующее действие на нервную систему, в отличие от препарата катионных пептидов, полученных методом ионообменной хроматографии. Последний, в свою очередь, не выявил достоверных эффектов ни в одном из тестов. Тревога, состояние ожидаемой опасности, характеризуется двигательным напряжением, симпатической гиперактивностью. Из полученных данных, представленных в таблицах 5, 6 и рисунках 6-9, видно, что два из трёх вводимых препаратов одновременно снижают вертикальную двигательную активность и увеличивают количество пересеченных секторов, в том числе расположенных в центральной области арены. Это говорит о значительном анксиолитическом эффекте обоих препаратов. Касаемо эмоционального компонента поведения, то раствор неочищенных пептидов мёда достоверно увеличивает параметр «груминг», не изменяя при этом параметр «обнюхивание», обозначающий интерес животных к расположенным в покрытии арены сквозным норкам. Число дефекаций при этом уменьшилось в 8 раз по сравнению с контролем.

Эти результаты указывают на то, что раствор низкомолекулярных компонентов мёда снимает эмоциональное напряжение животных, снижает общее возбуждение. Если рассматривать эпизоды груминга как показатель успешной адаптации к незнакомой среде, то их частота и продолжительность говорят о комфорте животного в заданных условиях [23]. Можно сказать, что данный раствор оказывает стресспротекторное действие, сравнимое с действием Селанка, который не проявил значимого эффекта на груминговые реакции, однако значительно повысил исследовательский интерес животных.

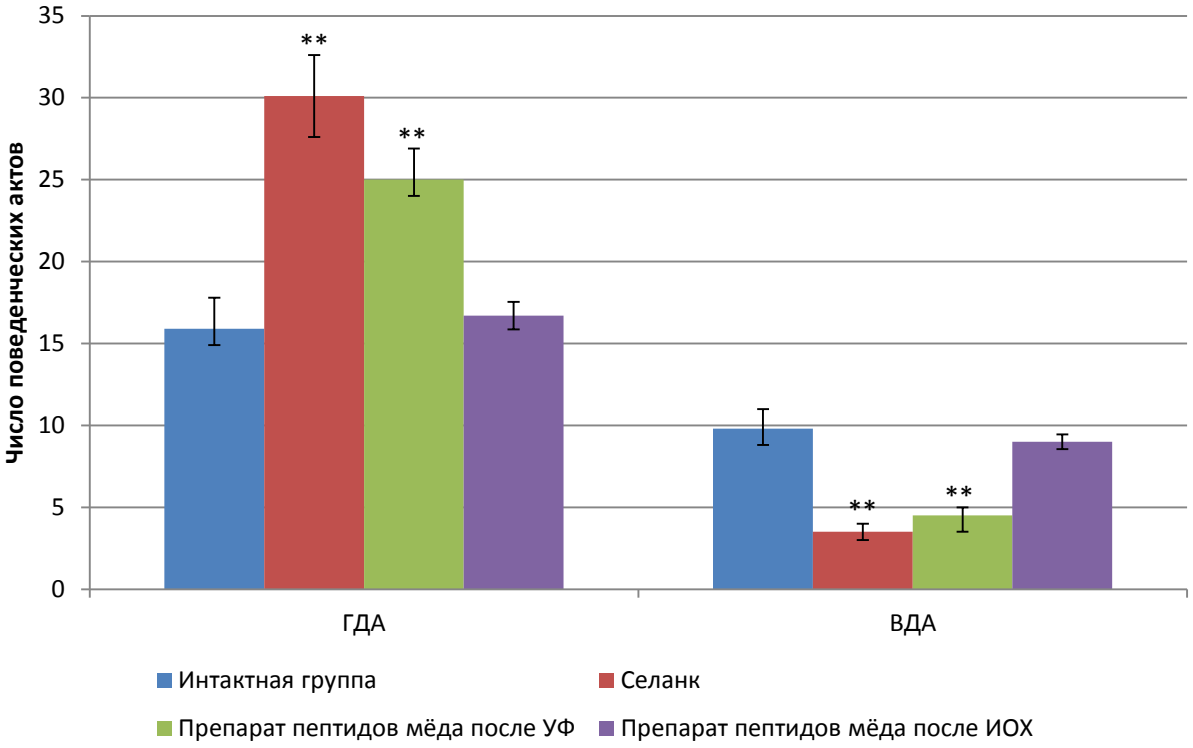

Рис. 6. Влияние пептидов 5-10 кДа на изменение параметров поведения по сравнению с контролем (M±m, n=5)

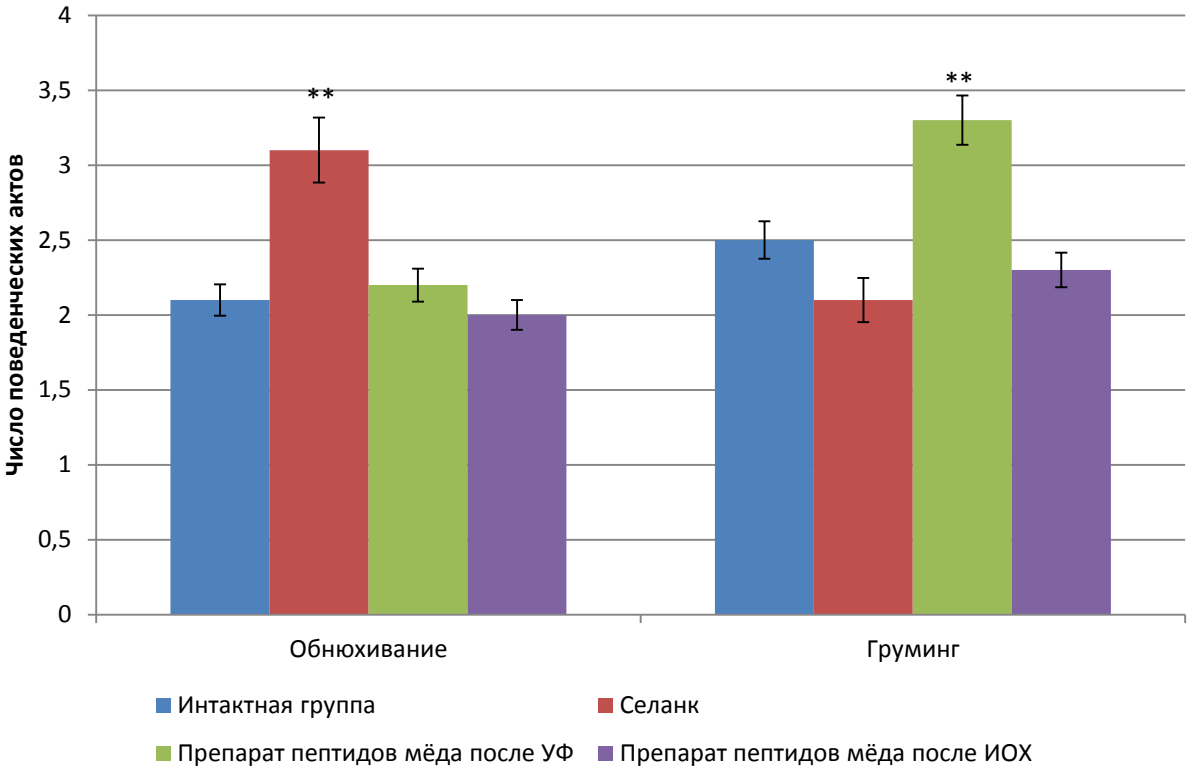

Рис. 7. Влияние пептидов 5-10 кДа на изменение параметров поведения по сравнению с контролем (M±m, n=5)

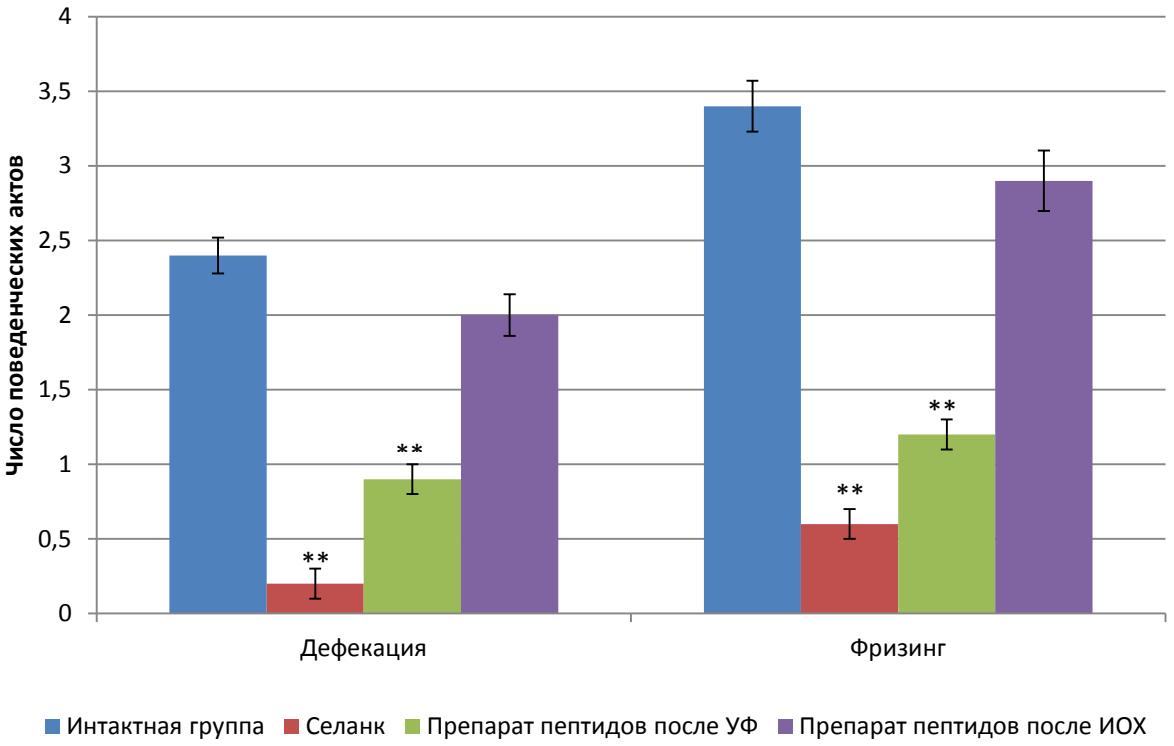

Рис. 8. Влияние пептидов 5-10 кДа на изменение параметров поведения по сравнению с контролем (M±m, n=5)

В тесте «Вынужденное плавание» два из трёх вводимых препаратов показали антидепрессантную активность (рис. 9). После введения раствора мёда продолжительность деятельности, направленной на побег из сосуда, увеличилась и одновременно уменьшилась продолжительность иммобилизации, что может говорить как о приобретении животным мотивации к спасению, так и об уменьшении общей стрессированности.

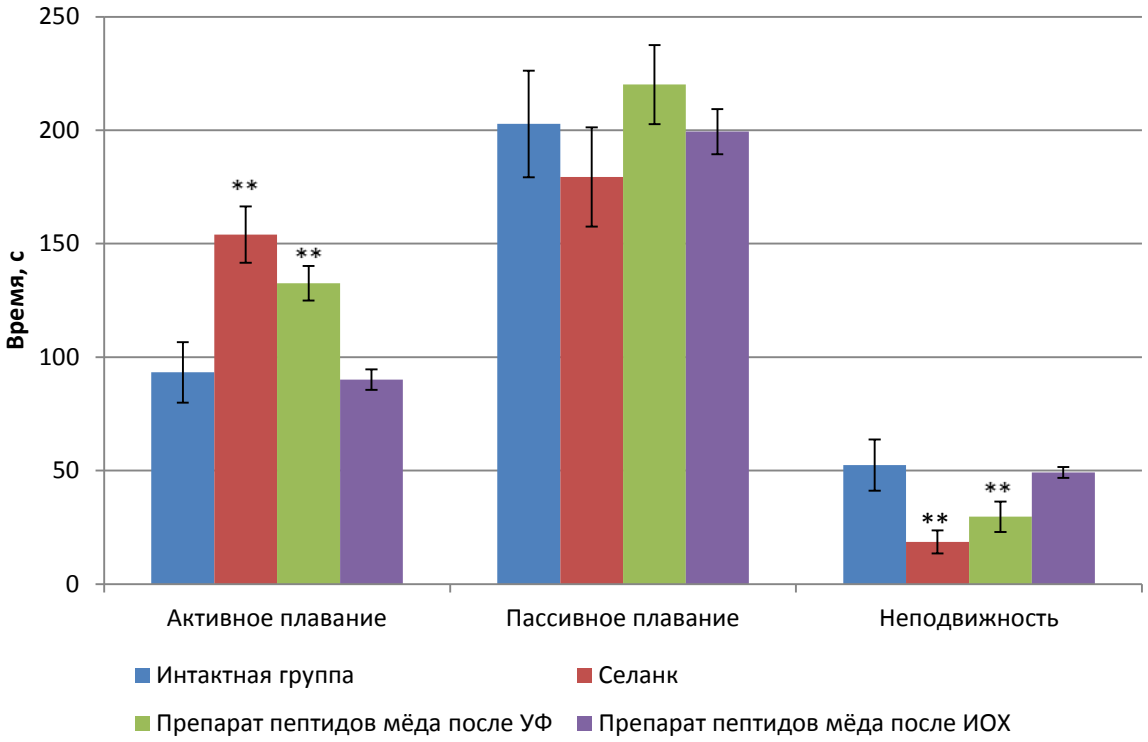

Рис. 9. Влияние пептидов 5-10 кДа на изменение параметров поведения по сравнению с контролем (M±m, n=5)

Анализ поведения крыс в совокупности двух тестов позволяет сделать вывод, что раствор компонентов мёда с молекулярной массой 5-10 кДа обладает депримирующими, транквилизирующими, стресспротекторными свойствами, в то время как выделенный методом ионообменной хроматографии препарат катионных пептидов не продемонстрировал указанных свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раствор мёда, отфильтрованный на установке VivaFlow, представляет собой смесь низкомолекулярных веществ, включая пептиды, углеводы, фенолы, пигменты и другие мелкие молекулы. Биологическая активность такого раствора может быть обусловлена как свойствами отдельных его компонентов, так и синергическим взаимодействием совокупности веществ. На основании результатов, полученных в данном исследовании, можно сказать, что очищенные катионные пептиды 5-10 кДа не являются таковым действующим веществом, обеспечивающим анксиолитическую активность мёда, однако совершенно ясно, что искомый компонент имеет такую же молекулярную массу. Этим компонентом могут быть нейтральные пептиды, не содержащие в своем составе заряженных аминокислот, и, соответственно, не адсорбирующиеся на ионитах и выходящие при хроматографии в первых фракциях вместе с углеводами. Флавоноиды также могут оказывать анксиолитический эффект за счет своей антиоксидантной активности.

Терапия тревожных расстройств и депрессивных состояний составляет на сегодняшний день актуальную задачу, поэтому поиск действующего компонента мёда представляет перспективную область для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод выделения и очистки фракции пептидов 5-10 кДа из концентрированного медового раствора.
2. Выявлено, что фракция пептидов 5-10 кДа составляет половину из всех пептидов мёда и примерно четверть всех белковых веществ. Количественное соотношение содержания пептидов к белкам и различных пептидных фракций друг к другу можно использовать в качестве маркера натуральности и качества мёда.
3. Установлено, что фракция 5-10 кДа, выделенная методом катионообменной хроматографии, представлена пептидами основного характера, с изоэлектрической точкой, сильно сдвинутой от нейтральных значений в щелочную сторону.
4. На основании поведенческих тестов показано, что препарат катионных пептидов не обладает анксиолитическими, стресспротекторными свойствами, в то время как раствор мёда, отфильтрованный на установке VivaFlow оказывает противотревожное действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артамонов, А. Ю. Биологическая активность и молекулярно-клеточные механизмы действия антимикробных пептидов человека и животных / А. Ю. Артамонов, Е. Г. Рыбакина, Д. С. Орлов, Е. А. Корнева // Вестник Санкт-Петербургского университета. — 2014. — Т.11, №1. — С. 5-25.
2. Измалкова, Н. А. Чудодействие пчелы / Н. А. Измалкова. — Воронеж: Центр.-черноземн. кн. изд-во, 1991. — 80 с.
3. Йориш, Н. П. Продукты пчеловодства и их использование / Н. П. Йориш. — М.: Россельхозиздат, 1976. — 175 с.
4. Кузник, Б. И. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований / Б. И. Кузник, В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон. — СПб.: Наука, 1998. — 310 с.
5. Младенов, С. Мед и медолечение / С. Младенов. — София, 1969. — 222 с.
6. Николаев, И. В. Изучение механизмов антиоксидантного действия пептидов и их композиций / И. В. Николаев // автореф. дис. на соискание уч. степени канд. хим. наук — Москва, 2012. — 26 с.
7. Окороченков, С. А. Антимикробные пептиды: механизм действия и перпективы практического применения / С. А. Окороченков, Г. А. Желтухина, В. Е. Небольсин // Биомедицинская химия. — 2012. — Т. 58, № 2. — С. 131-143.
8. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. — СПб.: Наука, 1985. — 536 с.
9. Пантелеев, П. В. Строение и биологические функции В-шпилечных антимикробных пептидов / П. В. Пантелеев, И. А. Болосов, С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова // Acta Naturae (русскоязычная версия). — 2015. — Т. 7, № 1(24). — С. 39-50.

10. Привольнев, В. В. Сравнительное исследование антибактериальной активности коммерческих препаратов мёда и нативного мёда в отношении штаммов с экстремальными фенотипами устойчивости к антимикробным препаратам / В. В. Привольнев, В. Г. Плешков, М. В. Эйдельштейн, М. В. Сухорукова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2015. — Т. 14, № 4. — С. 86-91.
11. Хавинсон, В. Х. Пептидная регуляция старения / В. Х. Хавинсон. — СПб.: Наука, 2009. — 55 с.
12. Чугунов, А. Неизвестные пептиды / А. Чугунов // Наука и жизнь. — 2010. — №10. — С. 26-31.
13. Шабанов, П. Д. Фармакологический профиль ноотропоподобных пептидов / П. Д. Шабанов, Лебедев А. А, Корнилов В. А// Психофармакология и биологическая наркология. — 2009. — Т. 9, №1-2. — С. 2517-2523.
14. Шабанов, П. Д. Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры / П. Д Шабанов // Психофармакология и биологическая наркология. — 2008. — Т. 8, №3-4. — С. 2399-2425
15. Шапиро, Д. К. Практикум по биологической химии. 2-е изд. / Д. К. Шапиро. — Минск: Вышэйш. школа, 1976. — 288 с.
16. Шатаева, Л. К. Пептидная саморегуляция живых систем. Факты и гипотезы / Л. К Шатаева, В. Х. Хавинсон, И. Ю. Ряднова. — СПб.: Наука, 2003. — 222 с.
17. Якубке, Х. Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х. Д Якубке, Х. Ешкайт. — М.: Мир, 1985. — 457 с.
18. Al-Waili, N. S. Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions / Noori S. Al-Waili // Med Sci Monit. — 2004. — V. 10, №8. — P. 94-98.
19. Blischenko, E. Y. Neokyotorphin and neokyotorphin (1-4): cytolytic activity and comparative levels in rat tissues / E. Y. Blischenko, O. A.

Mernenko, O. N. Yatskin, R. H. Ziganshin, M. M. Philippova, A. A. Karelin, V. T. Ivanov // Biochem Biophys Res Commun. — 1996. — V. 224, №3. — P. 721-727.

20. Blishchenko, E. Y. Antitumor effect of valorphin in vitro and in vivo: combined action with cytostatic drugs / E.Y. Blishchenko, O.V. Sazonova, O.A. Kalinina, E.V. Moiseeva, A.A. Vass, A.A. Karelin, V.T. Ivanov // Cancer Biol. — 2005. —№4. — P. 118-124.
21. Bouayed, J. Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. / J. Bouayed // Current Nutrition and Food Science. — 2010. — V.6, №1. — P. 13–18.
22. Brudzynski, K. Honey Glycoproteins Containing Antimicrobial Peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, Are Responsible for the Cell Wall Lytic and Bactericidal Activities of Honey / K. Brudzynski, C. Sjaarda // PLoS One. — 2015. — V.10, №4. — P. 230-238
23. Buccafusco, J. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, 2nd edition / J. Buccafusco. — CRC Press/Taylor & Francis, 2009. — 344 p.
24. Burgess, E. P. J. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (Apis mellifera) / E. P. J. Burgess, L. A. Malone, J. T. Christeller // J Ins Physio. — 1996. — №142. — P. 823–828.
25. Carnwath, R. The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates / R. Carnwath, E. M. Graham, K. Reynolds, P. J. Pollock // Vet J. — 2014. — V.199, №1. — P. 110-4.
26. Chedid, M. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1 / M. Chedid, J. S. Rubin, K. G. Csaky, S. A. Aaronson // Biol Chem. — 1994. — №269. — P. 10753-7.
27. Davidson, D. J. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization / D. J. Davidson, A. J. Currie, G. S. Reid, D. M. Bowdish, K. L.

MacDonald, R.C. Ma, R. E. Hancock, D. P. Speert // Immunol. — 2004. – — V. 172, № 2. — P. 1146-1156.

28. Dayer, J. M. Cachectin tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts / J. M. Dayer, B. Beutler, A. Cerami // Exp Med. — 1985. — №162. — P. 2163-8.
29. Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. / V. Falanga // Lancet. — 2005. — №366. — P. 1736—1743.
30. Fleischmann, J. Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2, cationic peptides from rabbit alveolar macrophages / J. Fleischmann, M. Selsted, R. I. Lehrer // Diagn. Microbiol. Dis. — 1985. — V. 3, № 3. — P. 233-242.
31. Fontana, R. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (Apis mellifera) / R. Fontanaa, M. A. Mendesb, B. Monson de Souzab, K. Konnoc, L. Mari Marcondes Césarb, O. Malaspinab, M. S. Palmab // Peptides. — 2004. — №25. — p. 919–928.
32. Gillitzer, R. Chemokines in cutaneous wound healing / R. Gillitzer, M. Goebeler // Leukoc. Biol. — 2001. — №69. — P. 513—521.
33. Goldstein, G. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells / G. Goldstein, M. Scheid, U. Hammerling, D. H. Schlesinger, H. D. Niall, E. A. Boyse // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1975. — V.72, №1. — P. 11-15.
34. Grego, E. Evaluation of antimicrobial activity of Italian honey for wound healing application in veterinary medicine / E. Grego, P. Robino, C. Tramuta, G. Giusto, M. Boi, R. Colombo, G. Serra, S. Chiadò-Cutin, M. Gandini, P. Nebbia // Schweiz Arch Tierheilkd. — 2016. — V.158, №7. – – P. 521-7.
35. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? / B. Halliwell // Journal of Neurochemistry. — 2006. — V. 97, №6. — P. 1634–1658.

36. Hegazi, A. Influence of honey on immune response against Newcastle disease vaccine / A. Hegazi, M. Abdou, F. A. Allah // Int J Basic Appl Virol. — 2013. — №2. — P. 1-5.

37. Ivanov, V. T. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool / V. T. Ivanov, A. A. Karelin, M. M. Philippova, I. V. Nazimov, V. Z. Pletnev // Biopolymers. — 1997. — V.43, №2. — P. 171-88.

38. Jackson, H. F. The effects of parachlorophenylalanine and stimulus intensity on open-field test measures in rats / H. F. Jackson, P. L. Broadhurst // Neuropharmacology. — 1982. — №21. — p. 1279-1282.

39. Karelin, A. A. A novel system of peptidergic regulation /A. A. Karelin, E. Blishchenko, V. T. // FEBS Lett. — 1998. — V. 428, №1-2. — P. 7-12.

40. Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Rosebrough N. J., Farr A.L., Randall R.J. // Biol Chem. — 1951. — V.193, №1. — P. 265-275.

41. Martin, P. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly / P. Martin, S. J. Leibovich // Trends Cell Biol. — 2005. — №15. — P. 599—607.

42. Niyonsaba, F. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells / F. Niyonsaba, A. Someya, M. Hirata, H. Ogawa, I. Nagaoka // Eur. J. Immunol. — 2001. — V. 31, № 4. — P. 1066-1075.

43. Okamoto, I. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo / I. Okamoto, Y. Taniguch, T. Kunikata, K. Iwaki, M. Ikeda // Life Sci. — 2003. — №73. — P. 2029–2045.

44. Papo, N. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes / N. Papo, Y. Shai // Peptides. — 2004. — V. 24, №11. — P.1693–703.

45. Radowski, M. Proteolytic enzymes from generative organs of flowering plants (Angiospermae) / M. Radowski // J Appl Genet. — 2005. — №46. – – P. 247–257.

46. Rahbi, B. Protective Effects of Tualang Honey against Oxidative Stress and Anxiety-Like Behaviour in Stressed Ovariectomized Rats / B. Rahbi // Int Sch Res Notices. — 2014. — №14. — P. 521-525.

47. Rahman, M. M. Neurological Effects of Honey: Current and Future Prospects / M. M. Rahman, S. H. Gan, M. I. Khalil // Evid Based Complement Alternat Med. — 2014. — №10. — P. 324-331.

48. Roshan, N. Antibacterial activity and chemical characteristics of several Western Australian honeys compared to manuka honey and pasture honey / N. Roshan, T. Rippers, C. Locher, K. A. Hammer // Arch Microbiol. — 2017. — V.199, №2. — P. 347-355.

49. Rossano, R. What are the proteolytic enzymes of honey and what they do tell us? A fingerprint analysis by 2-D zymography of unifloral honeys / R. Rossano, M. Larocca, T. Polito, A. M. Perna, M. C. Padula, G. Martelli, P. Riccio // PLoS One. — 2012. — V. 7, №11. — P. 149-154.

50. Sato, M. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form / M. Sato, D. Sawamura, S. Ina, T. Yaguchi, K. Hanada, I. Hashimoto // Arch Dermatol Res. — 1999. — №291. — P. 400—4.

51. Schmitzova, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera / J. Schmitzova // Cell Mol Life Sci. — 1998. — V.54, №9. — P.1020-30 .

52. Simuth, J. Some properties of the main protein of the honeybee (Apis mellifera) royal jelly / J. Simuth // Apidologie. — 2001. — №32. — P. 69–80.

53. Tonks, A. J. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4 / A. J. Tonks, E. Dudley, N. G. Porter, J. Parton, J. Brazier,

E. L. Smith // Journal of Leukocyte Biology. — 2003. — №82. — P. 1147-1155.

54. Tonks, A. J. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes / A. J. Tonks, R.A. Cooper, K.P. Jones, S. Blair, J. Parton // Cytokine. — 2007. — №21. — P. 242—247.

55. Won, S. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection / S. Won, D. C. Lee, S. H. Ko, J. W. Kim, H. I. Rhee // Food Res. Int. — 2008. — №41. — P. 952–956.

56. Yuping, L. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense / L. Yuping, R. L. Gallo // Trends Immunol. —2009. — v.30, №3. — P. 131—141.

57. Zanin, J. P. Growth factors and hormones pro-peptides: the unexpected adventures of the BDNF prodomain (pBDNF) / J. P. Zanin, N. Unsain, A. Anastasia // Journal of Neurochemistry. — 2017. — v. 141, №3. — P. 330–340.

58. Zeina, B. Effect of Honey versus Thyme on Rubella Virus Survival in Vitro / B. Zeina, M.D. Omar Othman, S. Al-Assad // The Journal Of Alternative And Complementary Medicine. — 1996. — V. 2, №3. — P. 345-348.

59. Zou, Z. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity / Z. Zou, D. L. Lopez, M. R. Kanost, J. D. Evans, H. B. Jiang // Ins Mol Biol. — 2006. — №15. — P. 603–614.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
_____ Г.А. Карпова
«2» 11 2016 г.

Задание

По ВКР студента Сергеевой Ольги Сергеевны

Тема работы: «Изучение физико-химических и биологических свойств фракции пептидов меда с молекулярной массой 5-10 кДа».

Утверждена приказом по Университету от «6» декабря 2016 г. №1191о/о

Срок сдачи студентом законченной работы «26» мая 2017 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения, глав обзора литературы («Лекарственные препараты пептидной структуры»; «Белки и пептиды пчелиного мёда»; «Биологическая активность пчелиного мёда»)	ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Оценка содержания белковых веществ и фруктозы в мёде	ноябрь - декабрь 2016	Выполнено
3	Выделение фракции пептидов 5-10 кДа методом ультафильтрации	декабрь 2016-январь 2017	Выполнено
4	Очистка искомой фракции пептидов от углеводного компонента методом ионообменной хроматографии и концентрирование полученного препарата	декабрь 2016-январь 2017	Выполнено
5	Оценка биологической активности препарата пептидов с молекулярной массой 5-10 кДа	декабрь 2016-февраль 2017	Выполнено
6	Статистическая обработка результатов исследования, анализ полученных данных	март-апрель 2017	Выполнено
7	Написание глав «Материалы методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Выводы»	февраль-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания «2» 11 2016г.

Руководитель _____ / М.Т. Гончи
(подпись)

Задание принял к исполнению _____
(подпись)