

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

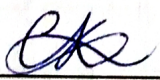
Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра «Общая биология и
биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

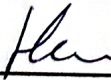
Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
на тему
«ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПЕПТИДОВ
МЕДА»

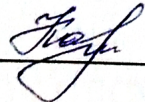
Студент  Клыченков Сергей Викторович

Научный руководитель  Кручинина А. Д.

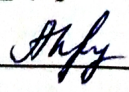
Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Рецензент  Невитов М.Н.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 04.06.18 № 13)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 15.06.18 № 4)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Антибиотикорезистентность — причины и механизмы её возникновения.....	5
1.2 Антимикробные пептиды и белки, их характеристика и перспективы использования в качестве антибактериального препарата.....	9
1.3 Антимикробные свойства мёда, наличие в мёде антимикробных пептидов, их источник.....	18
1.4 Антимикробные пептиды пчёл.....	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
2.1 Приготовление раствора мёда, ультрафильтрация.....	26
2.2 Очистка белков и пептидов раствора мёда от углеводов, их разделение ионообменной хроматографией.....	28
2.3 Спектрофотометрическое определение концентрации белков.....	30
2.4 Определение углеводов реакцией Селиванова.....	30
2.5 Концентрирование и очистка раствора белков и пептидов от буферного раствора гель–фильтрацией.....	31
2.6 Определение содержания цитрат–иона осаждением с хлоридом кальция.....	32
2.7 Тестирование раствора белков и пептидов на антибактериальную активность диско–диффузионным методом.....	33
2.8 Анализ белково–пептидного спектра препарата белков и пептидов мёда с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	34
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	36
3.1 Очистка от углеводов и разделение белков и пептидов методом ионообменной хроматографии.....	36
3.2 Удаление солей буфера из концентрированной смеси белков и пептидов, построение калибровочной кривой и приготовление конечного раствора очищенных белков и пептидов мёда.....	40

3.3 Анализ препарата белков и пептидов методом ВЭЖХ.....	43
3.4 Антибактериальное тестирование диско–диффузионным методом.	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	58

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время проблема бактериологической резистентности становится всё актуальнее. Применяемые в медицинской практике антибиотики постоянно устаревают из-за приобретения патогенными микроорганизмами устойчивости к ним, что побуждает исследовательские группы по всему миру к поиску новых антимикробных препаратов различной природы.

Перспективным направлением исследований в области поиска новых антимикробных препаратов является изучение антибактериальных свойств у молекул белковой природы, потому что в живой природе наблюдается широкое использование практически всеми организмами таких средств защиты.

Предыдущими исследованиями установлено, что раствор мёда обладает выраженным антибактериальным эффектом, однако до сих пор точно неизвестно, чем этот оказываемый эффект опосредован. В работе высказано предположение, что антибактериальный эффект может вызываться содержанием в мёде белковых молекул животного происхождения, обладающих антибактериальными свойствами.

Целью моей работы была проверка антибактериальных свойств пептидов и белков мёда. В ходе выполнения работы были поставлены следующие задачи:

1. провести анализ современной литературы на тему антибактериальной устойчивости, антимикробных пептидов и их механизма действия;
2. разработать метод выделения и очистки белковой фракции мёда;
3. провести качественный анализ белков и пептидов мёда, дана их характеристика как антибактериальных агентов.

Магистерская диссертация написана на 67 листах, содержит 22 рисунка, 4 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 81 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Антибиотикорезистентность — причины и механизмы её возникновения

В настоящее время проблема устойчивости патогенов к антибактериальным препаратам становится всё острее. Например, из доклада [7] Всемирной организации здравоохранения следует, что по всему миру 3,6% новых случаев туберкулёза и 20,2% уже существующих имеют антибиотикорезистентность (далее АБР), причём уровень устойчивости географически распределён неравномерно: максимумы приходятся на Восточную Европу и Центральную Азию; случаи устойчивости малярийного плазмодия к артемизинину фиксируются в Камбодже, Мьянме, Вьетнаме и Таиланде. По данным ВОЗ из различных источников с 2004 по 2010 в малоразвитых странах и странах среднего достатка наблюдается рост уровня устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам среди тех, кто только начинает поддерживающую терапию, а в Австралии, Европе, Японии и США 10-17% пациентов с ВИЧ, не принимающих антиретровирусные препараты, уже имеют невосприимчивость по крайней мере к одному из применяемых сегодня. В 2014 году АБР стала причиной смерти как минимум 50 000 людей в США и Европе [66].

Стоит отметить, что явление АБР далеко не ново — большинство антибиотиков являются природными молекулами или их синтетическими аналогами, то есть патогенные микроорганизмы уже сталкивались с ними и были вынуждены выработать методы защиты от них, а первый обнаруженный случай устойчивости к антибиотику зарегистрирован ещё в 1940 г. (пенициллин–устойчивый стафилококк) [71]. Основная проблема приобретения АБР патогенами состоит не в том, что определённый штамм устойчив к определённой группе лекарств, а в развитии мультирезистентности, то есть когда инфекция не поддаётся лечению либо

последовательно несколькими видами препаратов, либо одновременно их сочетанием. Мультирезистентность в большинстве случаев возникает в качестве больничных инфекций [48]. Например, через несколько лет после Второй мировой войны в клиниках Японии были обнаружены штаммы шигеллы (грамотрицательная палочковидная бактерия, возбудитель шигеллёзов), устойчивые к этим антибиотикам [75], а с 1957 г. с каждым годом росло количество найденных очагов АБР шигеллы, приобретшей мультирезистентность ещё и к стрептомицину, хлорамфениколу, тетрациклину.

Основные причины развития антибиотикорезистентности:

1. **Злоупотребление антибактериальными препаратами.** Встреча патогенов с антибиотиками приводит к изменению скорости их эволюции: чем чаще патоген встречает антибиотики, тем выше скорость эволюции бактерии [59]. В основе этого взаимодействия лежит тот факт, что гены резистентности бактерий возникли вместе с самими антибиотиками либо как защитный механизм в конкурентной борьбе, либо как защита от своего же «оружия». Современная медицина, применяя антибиотики, так или иначе эволюционно развивает некоторые из этих генов, поэтому применение антибиотиков без веской на то причины приводит к тому, что в малой популяции патогенов при отсутствии заболевания происходит отбор в сторону признака устойчивости. По последним данным, за 15 лет (с 2000 по 2015 гг.) глобальное потребление антибиотиков на одного человека выросло на 39%, суммарное использование антибиотиков выросло на 65% (расхождение в цифрах вызвано ростом численности человечества) [11]. Самый большой рост демонстрируют развивающиеся страны и страны с промежуточной экономикой. По прогнозу исследователей [42], к 2030 году потребление антибиотиков в мировом масштабе удвоится по сравнению с 2015 г.
2. **Неверный выбор антибиотика** опосредованно влияет на развитие

устойчивости. Все известные на сегодня группы антибиотиков так или иначе влияют на метаболизм бактериальной клетки. Показано, что встреча с антибиотиком, даже если он не оказывает антибактериального эффекта, изменяет экспрессию генов бактерии [72] и может привести к мутациям или активации генов устойчивости, равно как их распространению с помощью горизонтального переноса по всей популяции. Исследования сообщают неутешительные новости: от 30% до 60% всех назначаемых антибиотиков в отделениях интенсивной терапии принимаются зря, потому что либо в этом нет необходимости, либо выбран неверный антибиотик, либо неверная концентрация [50].

3. Наиболее важная причина — использование **антибиотиков в сельском хозяйстве**, при чём эта практика широко распространена не только в развивающихся странах, но и развитых [8]. Практически 80% от всех проданных в США антибиотиков пришлось на долю сельского хозяйства для использования в качестве профилактики возникновения инфекционных болезней среди скота [33]. С одной стороны, профилактика антибиотиками приводит к повышению уровня здоровья животных, но с другой стороны, во-первых, антибиотики из мяса скота попадают в человеческий организм, во-вторых, из-за применения препаратов без необходимости патогены с устойчивостью могут инфицировать человека. Более того, антибиотики попадают вместе со стоками и отходами корма в окружающую среду, накапливаются там и двигают отбор в сторону антибактериальной устойчивости. Показано [8], что до 90% антибиотиков выходят из организма сельскохозяйственных животных в неизменном виде вместе с мочой и экскрементами, откуда впитываются в почву и дальше разносятся грунтовыми водами, осадками или задерживаются в почве, оказывая влияния на почвенную микрофлору.

Очевидно, что бесконтрольное использование антибиотиков и

попадание их в окружающую среду являются главными причинами возникновения антибактериальной устойчивости.

До сих пор речь шла о причинах возникновения АБР, однако выявление механизмов развития резистентности является приоритетным направлением работы в этой области. Только понимание процессов, лежащих в основе резистивности, даст возможность предотвратить возникновение устойчивости при использовании новых типов антибиотиков.

Во-первых, некоторые группы бактерий по своей природе устойчивы к определённым типам препаратов. Например, анаэробные бактерии невосприимчивы к аминогликозидам, т. к. попросту не имеют метаболических путей для кислородного дыхания, которые подвергаются воздействию аминогликозидов; энтерококки невосприимчивы к бета-лактамам антибиотикам, т. к. не имеют белков, с которыми связываются эти препараты. Сюда же можно отнести и способность бактерий инактивировать молекулы антибиотика, ферментативно модифицируя их. Например, *Staphylococcus aureus* имеет устойчивость к пенициллинам, потому что синтезирует фермент β -лактамазу, которая гидролизует β -лактамное кольцо в молекулах этого типа антибиотиков.

Во-вторых, из-за высокой скорости смены поколений мутации играют большую роль в развитии бактериальных колоний. Например, мутации, связанные с 23S rRNA, у *Enterococcus spp.* вызывает невосприимчивость бактерий к линезолиду [5]. Аналогичная ситуация наблюдается в отношении *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* [34]. Мутации могут приводить к изменению структуры и пространственного расположения рецепторов, с которыми связываются антибиотики.

В-третьих, именно из-за горизонтального переноса генов АБР столь быстро распространяется по популяции. Существует несколько путей передачи устойчивости с помощью этого механизма: гены устойчивости ассоциированы с мобильными генетическими элементами (транспозоны, плазмиды) и передаются от клетки к клетке, бактериальная конъюгация и

потеря синтении [40].

В-четвёртых, большую роль в формировании устойчивости играет способность многих видов патогенов формировать биоплёнки. Известно, что планктонные формы бактерий больше подвержены действию антибиотиков, чем бактерии того же штамма, находящиеся в биоплёнке [37]. Предполагается, что это явление вызвано наличием межклеточных взаимодействий между бактериальными клетками (quorum sending), функционированием эффлюксных насосов (белков–переносчиков, которые «выкачивают» из бактериальной клетки молекулы токсинов и антибиотиков) и закрытием «входных» белков–переносчиков для предотвращения попадания антибиотиков внутрь клетки [81].

Резюмируя, можно сказать, что АБР возникает вследствие нерационального использования антибиотиков в комбинации с генетическими особенностями бактерий.

1.2 Антимикробные пептиды и белки, их характеристика и перспективы использования в качестве антибактериального препарата

Данные [74] о темпах развития АБР и, как следствие, устаревание препаратов, заставляют искать всё новые и новые типы антибиотиков, но не смотря на это из 18 крупнейших мировых фармацевтических компаний 15 закрыли разработки в области получения новых типов антибиотиков, а слияние более мелких компаний для укрупнения бизнеса и повышения конкурентоспособности уменьшает количество исследовательских групп [8]. Исследования новых типов антибиотиков в университетах и научных центрах, не связанных с фармацевтическими компаниями, сворачиваются из-за недостатка финансирования, вызванного мировым экономическим кризисом [57]. Разработка новых типов антибактериальных средств больше не приносит выгоды, если вести сравнение с препаратами от других заболеваний (диабет, психические расстройства, астма, заболевания ЖКТ):

антибиотики принимаются коротким курсом и часто успешно, поэтому покупаются сравнительно редко, плюс их стоимость заметно ниже, чем, например, препаратов для химиотерапии рака. Управление здравоохранения Лондона подсчитало, что на разработку новых антибиотиков тратится 50 млн. долл., тогда как на разработку средств для терапии нейро–мышечных заболеваний уходит свыше 1 млрд. долл. Тем не менее, исследования в этой области ведутся, потому что проблема поиска новых типов антибиотиков вместе с разработкой правил их рационального использования будет актуальна всегда.

Решить проблему поиска новых антибактериальных средств можно с помощью применения в качестве антибиотика антимикробных пептидов (АМП). АМП синтезируются в ответ на встречу с патогеном практически всеми живыми существами, в том числе и бактериями. На сегодняшний день в базе данных Antimicrobial Peptide Database (APD) содержатся записи о 2980 известных пептидах (на рис.1 изображено распределение АМП по царствам живой природы).

Исторически первыми были открыты в 1947 бактериоцины — АМП бактерий. Первый представитель этого семейства был назван низин [52], выделенный из культур *Lactococcus lactis* и обладающий высокой активностью в наномолярных концентрациях против различных грамположительных бактерий. В последующие годы было открыто ещё несколько сотен представителей бактериоцинов и стало понятно, что всё семейство этих АМП можно разделить на лантибиотики и нелантибиотики по наличию в структуре необычной аминокислоты лантионина. Первыми открытыми антимикробными пептидами эукариот стали цекропины в 1980 г, выделенные из гемолимфы личинок *Hyalophora cecropia* [38], после чего в 1985 г. АМП, имеющие антигрибковую [64] и противовирусную активность [47], были выделены из лейкоцитов кролика. Первыми найденными антимикробными пептидами человека стали открытые в том же году дефензины, выделенные из нейтрофилов [31]. Сейчас известно, что у

человека АМП продуцируются большинством клеток иммунной системы в ответ на обнаружение инфекции [35].

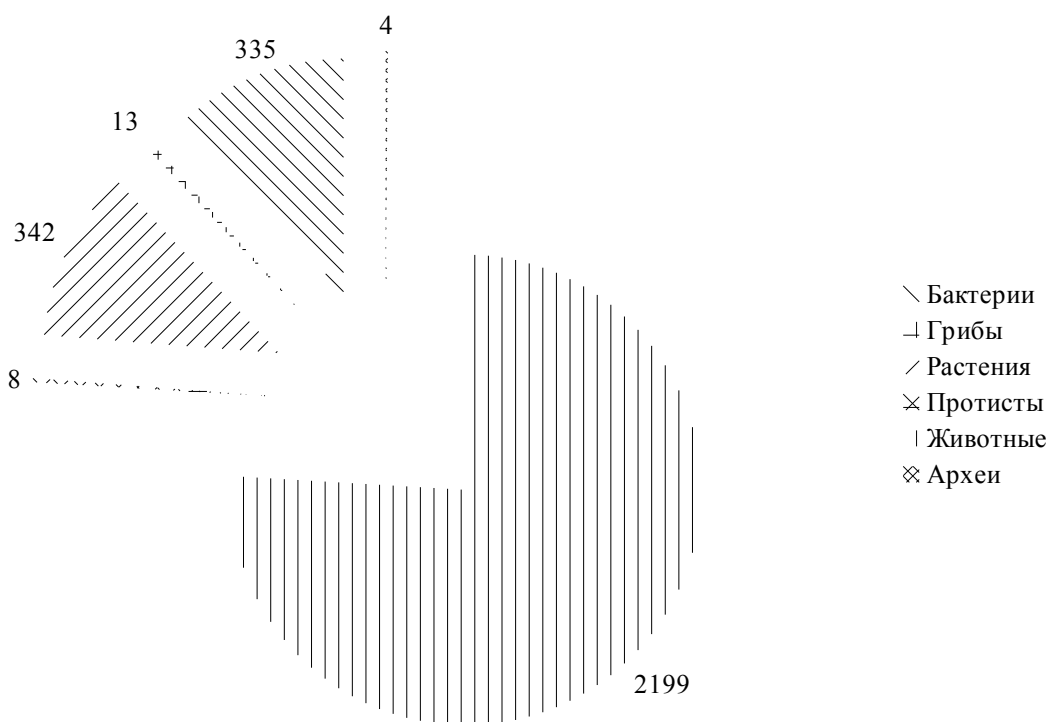


Рисунок 1. Распределение антимикробных пептидов в царствах живого по данным Antimicrobial Peptide Database (APD)

Из-за широкого разнообразия АМП построить их классификацию затруднительно, поэтому обычно их классифицируют по нескольким признакам:

1. По строению:
 - α -спиральные (цекропин, кателицидины);
 - β -складчатые (α - и β -дефензины человека, свиные протегрины);
 - извитые (гистатины человека, бычьи индолицидины).
2. По заряду:
 - катионные;
 - анионные.

Первую группу, α -спиральные АМП, чаще всего можно найти в

межклеточном матриксе земноводных и насекомых. Многие из этих пептидов в водном растворе не структурированы, однако в приобретают нативную конформацию при растворении в трифторэтаноле, детергентах (например, додецилсульфате натрия), мицеллах и липосомах [12, 15]. Широко изученными α -спиральными АМП человека являются кателицидины — наиболее разнообразная группа антимикробных пептидов позвоночных. Кателицидины обычно в длину 12-80 а. о., часто содержат различные структурные особенности (например, амидированный С-конец). К группе α -спиральных АМП относятся также и LL-37, играющий важную роль в иммуномодуляции и воспалении, магайнины (изначально найдены у африканской лягушки *Xenopus laevis* и активны против грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, дрожжей и вирусов) [78], ауреины (найлены у австралийской лягушек *Litoria aurea* и *L. raniformis*, пептиды активны против грамположительных бактерий и 30-50 типов рака [62]).

Вторая группа, β -складчатые АМП, объединяет протегрины, дефинзины и тахиплезины. Практически все такие пептиды имеют в своей структуре остатки цистеина, которые образуют дисульфидные мостики, стабилизирующие форму молекулы и защищающие от протеаз [27]. Из-за своего строения молекулы пептидов имеют нативную конформацию в растворе, а не в интеграции в биомембраны, но при этом не изменяются при встраивании в последние. Дефензины являются большой группой пептидов, деление на подсемейства производят на основе локализации дисульфидных мостиков. Дефензины участвуют в антибактериальном ответе, активны против грибов, вирусов, опосредуют иммунный и воспалительный ответы. Нокаут генов мышей, которые кодируют дефензины, показывает, что α -дефензины играют критическую роль в защите против *Escherichia coli* [76] и *Salmonella enterica* [63]. Тахиплезины и полифемузин — другие β -складчатые АМП, были выделены из гемоцитов мечехвостов.

Третья группа антимикробных пептидов имеет уникальную извитую структуру из-за содержания пролина, который препятствует сворачиванию

пептидной цепи в спираль или формированию β -слоёв. Например, индолицидин, выделенный из бычьих нейтрофилов состоит всего из 13 аминокислот, 3 из которых — пролин [29], что позволяет сформировать структуру, облегчающую взаимодействие с мембранами.

Не смотря на большое разнообразие в структуре молекулы, аминокислотной последовательности и происхождении, функции всех АМП примерно одинаковы. Главное назначение антимикробных пептидов — элиминация чужеродных агентов, будь то вирусы, бактерии или грибки. Достигается это несколькими способами, для объяснения которых требуется уточнить, что на сегодняшний день подавляющее большинство открытых АМП — катионные, т. е. имеют положительный суммарный заряд молекулы при условиях среды, в которой проявляются их антибактериальные свойства. Например, из более сотни антимикробных пептидов, продуцируемых клетками человека, всего лишь 15 являются анионными, то есть суммарно заряжены отрицательно [9].

Прямой механизм действия катионных АМП можно описать несколькими моделями, в соответствии с которыми антимикробное действие достигается взаимодействием АМП и бактериальной мембраны с последующим нарушением функционирования последней, что влечёт гибель клетки. Взаимодействие может быть как рецепторное, так и неспецифическое. Рецепторный механизм действия в большинстве своём характерен для бактериоцинов. Например, так действует низин [14], молекула которого имеет два домена: один из них имеет высокое сродство к липиду II, прекурсор молекул клеточной стенки, а второй домен встраивается в мембрану и формирует пору. Однако большинство АМП позвоночных и беспозвоночных взаимодействуют с бактериальной мембраной без специфического связывания с определёнными молекулами. Ключевым фактором такого неспецифического взаимодействия является заряд молекул. Как уже упоминалось, катионные АМП заряжены положительно, тогда как компоненты клеточной стенки бактерий — тейхоевая кислота и

липополисахариды — заряжены отрицательно, поэтому АМП электростатически притягиваются к мембране бактерий и нарушают её структуру. Не смотря на кажущуюся простоту этого взаимодействия, довольно сложно однозначно объяснить тот факт, что антимикробные пептиды, действующие по такому механизму, начинают оказывать действие только после накопления в определённой концентрации [6]. Модели, объясняющие это явление, можно разделить на две категории. В соответствии с первой, пептиды взаимодействуют с мембраной и формируют в ней поры. Например, модель «бочка» объясняет это так: молекулы пептидов вертикально встраиваются между молекулами мембраны и формируют поры, выстланные изнутри АМП, которые функционируют подобно ионным каналам, однако совершенно не регулируются бактериальной клеткой [15], что нарушает её трансмембранный потенциал. Для действия подобным образом, пептиды должны иметь небольшой размер (примерно от 8 до 22 аминокислотных остатков). Всего лишь несколько АМП взаимодействуют с мембранами в соответствии с моделью «бочка», среди них протегрины [15], пардаксины [58] и аламетицин [77]. По другой модели, модели тороидальных пор, пептиды также перпендикулярно встраиваются в билипидный слой мембраны, однако выстланных пор не образуется, вместо этого пептидные молекулы искривляют слой липидов, взаимодействуя с гидрофобными «головками» этих молекул. При этом тоже образуются неконтролируемые поры, что ведёт к деполяризации мембраны. Тороидальные поры формируют, например, магайнин 2, лактин Q [46] и т. д. В соответствии с третьей моделью порообразования — моделью ковра — антимикробные пептиды взаимодействуют с мембраной параллельно, накапливаясь на её поверхности. При достижении пороговой концентрации, АМП нарушают целостность мембраны подобно детергентам, формируя мицеллы с пептидами внутри. Подобное мембранолитическое действие не предъявляет к молекулам пептидов особых требований, поэтому так ведут себя многие АМП, как например цекропин [68], индолицидин [61], LL-37 [65] и т. д. Интересно, что

действие ауреина 2.2 зависит от липидного состава мембраны: при соотношении POPC/POPG 1:1 (POPC — 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицерол-3-фосфохолин, POPG — 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-гас-глицерол)) пептид формирует тороидальные поры, при соотношении DMPC/DMPG 1:1 (DMPC — 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, DMPG — 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-гас-глицерол)) действует по модели ковра, что свидетельствует о важности толщины гидрофобного слоя мембраны и её состава [25].

В соответствии с объяснением прямого механизма действия целью АМП являются либо молекулы клеточной стенки бактерий, либо молекулы внутри клетки. Например, дефензины связываются с отрицательно заряженным пирофосфатом углеводной части липида II, что приводит к формированию поры и нарушению функционирования бактериальной мембраны [51]. Долгое время предполагалось, что АМП взаимодействуют с бактериальной клеткой только на её поверхности, нарушая структуру мембраны, что доказывалось одинаковой активностью D- и L-изомеров пептидов, однако более поздние исследования показали, что это правило соблюдается не у всех пептидов и даже более того, при минимальной ингибирующей концентрации некоторые пептиды не оказывают влияния на мембрану, однако гибель бактерий всё же достигается [15]. Предполагается, что либо такие АМП неспецифически проникают внутрь клетки, либо проникают через уже существующие поры, либо взаимодействуют с рецепторами на поверхности мембраны и переносятся через мембрану активным транспортом. Внутри клетки такие пептиды нарушают функционирование синтетического аппарата. Например, буфорин II проникает через мембрану бактерий без нарушения её целостности и связывается с ДНК и РНК *Escherichia coli* [55], целый ряд человеческих АМП имеют внутриклеточные цели (β -дефензин 4, α -дефензин 1, PR-39 [43]).

Прямое действие анионных АМП, очевидно, не может проявляться в результате электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной

мембраной бактерий. Например, SAAP (суфрактант–ассоциированный анионный пептид, найденный в дыхательных путях овец и быков) оказывает антибактериальное действие в сравнительно высоких для антимикробных пептидов концентрациях (>600 мкмоль/мл), когда играет роль общий цитотоксический эффект, однако более поздние исследования показывают, что при наличии в среде ионов Zn^{2+} минимальная ингибирующая концентрация снижается в 10 раз. Предполагается, что ионы цинка формируют «мостики» между концом молекулы пептида и мембраной бактерии, что позволяет SAAP пройти через последнюю и атаковать внутриклеточные цели [16]. Другой пример механизма работы анионного АМП — дермицидин, один из наиболее изученных человеческих пептидов такого рода. Дермицидин секретируется вместе с потом на поверхность кожи, где распадается на DCD-1 и DCD-1L — оба пептида имеют суммарный заряд -2 и показывают максимальную антимикробную активность в микромолярных концентрациях при высоких значениях NaCl и низком pH против *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Эти бактерии являются доминантными видами микробов на поверхности кожи и сильными назальными патогенами, а также именно эти виды часто формируют биоплёнки на поверхности медицинских инструментов (например, катетеров). Оба пептида также высокоактивны против назальных *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, против метициллин–устойчивого золотистого стафилококка, устойчивому к рифампицину и изониазиду *Mycobacterium tuberculosis* и ещё целому ряду грамотрицательных бактерий. Показано, что при атопическом дерматите наблюдается снижение концентрации дермицидина и производных пептидов в поте [73]. Все эти доводы свидетельствуют о том, что дермицидин является одним из ключевых факторов кожного иммунитета. Предполагается, что дермицидин–производные пептиды связываются с бактериальной мембраной по типу «лиганд–рецептор», что нарушает её функционирование [70].

В целом, количество информации об анионных антимикробных

пептидах и механизмах их действия слишком мало для того, чтобы сделать какие-либо выводы об их роли в иммунитете (кроме отдельных молекул, например, дермицидина), однако с каждым годом информации о них появляется всё больше и больше, что вселяет надежду на структурирование и систематизацию знания об этих молекулах.

Непрямой механизм действия АМП заключается в иммуномодуляции [36]. Например, LL-37 и β -дефензины являются хемоаттрактантами для лейкоцитов, тучных и дендритных клеток [32, 53, 49], кателицидины являются хемоаттрактантами для моноцитов, многие АМП взаимодействуют с нейтрофилами и макрофагами, есть данные о способности антимикробных пептидов управлять адаптивной иммунной системой через регуляцию Т- и В-лимфоцитов [36]. *In vitro* кателицидины вызывают транскрипцию хемокинов [13], *in vivo* — участвуют в регуляции высвобождения гистамина [53].

Использовать АМП в качестве антибактериального препарата — логичное предложение, учитывая вышеперечисленные особенности этих веществ. Действительно, в этой перспективной области исследований уже ведутся разработки по использованию антимикробных пептидов как средства поддержки при, например, муковисцидозе [80], для лечения акне [39], как компонент средства для лечения заболеваний дёсен [60] и т. д. Упомянутый ранее низин, например, уже много лет используется в пищевой промышленности как эффективный консервант [41]. Уникальный механизм действия многих АМП, основанный на фундаментальных свойствах бактериальной мембраны, не позволит развиваться бактериальной устойчивости, однако будет безопасен для клеток человека из-за различия в липидном составе [43]. Одной из главных проблем при разработке препаратов с АМП является их протеолитическая деградация *in vivo* [39], которую, однако, можно обойти, применив модифицированные аналоги природных пептидов, обладающие той же антибактериальной активностью. АМП также могут использоваться как «шаблоны» при разработке полностью

синтетических пептидов с учётом структурных особенностей первых, что позволит сочетать не только качества природных аналогов (эффективность при низких концентрациях, уникальный механизм действия, комплексность действия), но и привносить в такие препараты новые (активность против новых видов патогенов, изменение механизмов фармакокинетики, синергия с антибиотиками и т. д.).

1.3 Антимикробные свойства мёда, наличие в мёде антимикробных пептидов, их источник

Известно, что мёд проявляет выраженные антимикробные свойства, а также долго не портится даже при комнатной температуре, не зарастает грибами. Эти свойства связывают с:

- высоким содержанием углеводов. В мёде содержатся в основном фруктоза и глюкоза, намного меньше сукрозы и мальтозы (общим количеством до 80%). Такая высокая концентрация сахаров и малое количество воды (меньше 18%) оказывают сильный осмотический стресс на микроорганизмы, что предотвращает колонизацию мёда бактериями и грибами [44].
- кислым значением pH из-за содержания органических кислот. Их состав может отличаться в зависимости от географического и ботанического происхождения, однако наиболее часто встречаются муравьиная, уксусная, пропионовая, бутировая и изобутировая, янтарная, лимонная и изолимонная, винная, глюконовая и молочная кислоты [26], что сдвигает общий pH мёда в кислую область (значения pH изменяются в зависимости от содержания кислот и других компонентов, но в основном находятся между 3,2 и 4,5 [44]).
- наличием фенольных соединений. Фенольные соединения попадают в мёд из растительного сырья, их можно разделить на две группы — феноловые кислоты и флавоноиды. Первая группа — необходимые

метаболиты для нормального функционирования растений, они являются антиоксидантами, защищая их от свободных радикалов. Феноловые кислоты мёда можно отнести к двум подгруппам — гидроксibenзойны и гидроксикоричные [24], однако большую часть фенольных соединений в мёде составляют флавоноиды. В растениях флавоноиды служат для защиты от ультрафиолета, радиации, патогенов и вирусов. В мёде идентифицированы следующие фенольные соединения: ванилиновая, кофеиновая, сиреневая, кумаровая, феруловая, эллаговая, хлорогеновая, 3- и 4-гидроксibenзойная, розмариновая, галловая, бензойная кислоты, кверцетин, камферол, мирицетин, пинобанксин, пиноцембрин, кризин, галангин, гесперитин и некоторые другие [56].

- образование АФК и метилглиоксала. В мёде содержится фермент глюкооксидаза, который превращает глюкозу в пероксид водорода H_2O_2 и глюконовую кислоту в аэробных условиях. Основная функция глюкооксидазы — образование пероксида в условиях наработки мёда, когда концентрация углеводов ещё не столь высока для обеспечения защиты от колонизации патогенами. При накоплении достаточного количества углеводов, фермент ингибируется (при разбавлении — активируется) [44]. На скорость накопления пероксида также влияют свет и температура. Некоторые сорта мёда демонстрируют, однако, антибактериальную активность без содержания в них H_2O_2 . Самый известный из них — мёд тонкосемянника (манука — *Leptospermum scoparium*), получаемый в Новой Зеландии. Оказалось, что в таком мёде содержится в высокой концентрации метилглиоксаль [2]. Сам по себе метилглиоксаль образуется из углеводов под действием высокой температуры или длительного хранения продуктов пищи, однако в мёде он образуется неферментативным путём в процессе длительного хранения из дигидроксиацетона, концентрация которого необычно высока в нектаре тонкосемянника [3]. Например, концентрация

метилглиоксала в различных пищевых продуктах колеблется в пределах от 3 до 47 мг/кг, а в мёде тонкосемянника от 38 мг/кг до 1,541 г/кг (в других сортах мёда концентрация не превышает 24 мг/кг) [2].

Все вышеперечисленные факторы антибактериальности мёда оказывают суммарный ингибирующий эффект на тестовые культуры *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhodotorula mucilaginosa* и др., что является логичным, ведь мёд является для пчёл как пищевым продуктом, так и средой для развития личинок, поэтому порча мёда колонизацией патогенами крайне нежелательна.

Однако содержание перечисленных компонентов не объясняет тот факт, что антимикробные свойства мёда сохраняются вплоть до разбавления до 10% [4]. Очевидно, что за антибактериальные свойства при таких разведениях должны отвечать какие-то другие агенты, проявляющие своё действие уже при низких концентрациях. На роль таких веществ идеально подходят антимикробные пептиды.

Действительно, недавние исследования подтверждают, что в мёде содержатся джелейны — АМП, производные главного белка маточного молочка (MRJP) — MRJP-1, MRJP-2 и MRJP-4, оказывающие литическое действие на клеточную стенку *E. coli* и *B. subtilis* [17] и пчелиный дефензин-1 (роялзин), активный против тех же бактерий, плюс против *Paenibacillus larvae* [45]. В мёд эти пептиды попадают из организма пчелы вместе со слюной при переработке насекомыми нектара растений. Литературы, в которой бы описывалось содержание АМП в пыльце или нектаре не найдено, поэтому можно утверждать, что пчела — единственный источник антимикробных пептидов мёда (как и в остальных пчелопродуктах, в том числе маточном молочке и перге).

На основании того, что в мёд роялзины и джелейны попадают вместе со слюной при переработке мёда, можно предположить, что в этом продукте

будут найдены и другие АМП пчёл. Ниже приведена их краткая характеристика.

1.4 Антимикробные пептиды пчёл

Пчёлы, являясь социальными насекомыми, обладают помимо системы врождённого иммунитета уникальным коллективным иммунитетом, включающий в себя поведенческие механизмы защиты жилища. К таким механизмам относятся:

1. Инстинкт чистки, когда уничтожаются заражённые личинки, либо изгоняются из улья взрослые особи для предотвращения дальнейшего заражения.
2. Накопление и использование прополиса — переработанного пчёлами вещества растительного происхождения с высоким содержанием фенольных и дубильных веществ, которым заделываются отверстия в улье [67].
3. Коллективная лихорадка, выражающаяся в повышении внутренней температуры улья путём повышения температуры тела всеми особями улья для уничтожения паразитов и бактериальных инфекций [69].
4. Высокий оборот особей и деление семьи [1] и некоторые другие.

Вследствие коллективизации иммунитета у пчёл произошло снижение роли индивидуального иммунитета, что доказывается снижением количества задействованных в работе иммунной системы генных семейств по сравнению с другими видами семейства Двукрылых [28].

К индивидуальным механизмам врождённой системы иммунитета пчёл относятся следующие антимикробные пептиды, найденные в гемолимфе при моделировании бактериального заражения:

1. Апидаецин. Как указывается авторами оригинального исследования [21], апидаецин (GNNRP(V/I)YIPQPRPPHPR(L/I)) является основным гуморальным фактором иммунитета медоносной

пчелы. В аминокислотной последовательности этого AMP 33% составляет пролин, что исключает возможность спиральной структуры. Апидаецины являются катионными антимикробными пептидами, всего идентифицировано три формы: Ia, Ib и II. Они обладают высокой стабильностью, не теряют своих свойств при $pH = 2$ и высокой температуре, в гемолимфе взрослых пчёл находится преимущественно в активной форме, в то время как у личинок большая его часть циркулирует в виде предшественника. Апидаецины высокоактивны против многих патогенов растений и некоторых человеческих, но только грамотрицательных бактерий, оказываемое на них действие бактериостатическое, а не литическое. Предполагается, что целью апидаецина является белок-синтезирующий аппарат бактерий, т. е. апидаецины не относятся к классу порообразующих катионных AMP [23]. Было показано, что эти пептиды неспецифически проникают через внешнюю отрицательно заряженную оболочку грамотрицательных бактерий, попадают в периплазматическое пространство, свободно проходят через клеточную мембрану и ингибируют синтез белка в бактериях. Другая более поздняя работа указала на то, что мишенью апидаецинов являются шапероны, разрушение которых нарушает нормальный процесс фолдинга многих белков [54]. Исходя из того факта, что апидаецины активны только в отношении грамотрицательных бактерий, ассоциированных с растениями, можно предположить, что эти пептиды — эволюционное приобретение пчёл, специально «разработанное» для защиты от наиболее встречаемых угроз. Сообщается, что искусственно синтезированный апидаецин обладает ни чуть не меньшей антибактериальной активностью, чем его природный вариант, что является аргументом за использование этого AMP в качестве антибиотика наравне с отсутствием токсичности.

2. Абаецин. Другой тип AMP, синтезируемых пчёлами — абаецины,

является менее активным антибактериальным компонентом, чем апидаецина (по отношению к грамотрицательным микроорганизмам), но проявляет высокую активность против бактерий рода *Xanthomonas*, которые устойчивы к апидаецинам, а также более высокую активность против грамположительных микроорганизмов. Длина этого пептида — 34 а. о. (YVPLPNVPQPGRRPFPTFPGQPGNPKIKWPQGY), отмечается высокое содержание пролина (10 а. о., которые равномерно распределены по всей молекуле, что также исключает сворачивание в α -спираль), замедленное бактериостатическое действие. В отличие от апидаецина, который обнаруживается в лимфе спустя короткое время после заражения, максимальное содержание абаецина регистрируется только на вторые сутки. Зависимость антибактериальной активности от условий среды — ещё одно отличие. Когда апидаецин исправно выполняет свои функции при низких значениях pH и высоких температурах, абаецин проявляет максимум антибактериальной способности при малой ионной силе. Дальнейших исследований с целью расширить знания о механизме действия абаецина или попыток синтезировать его искусственно не проводилось (или они не были опубликованы). Отсутствуют также данные и о механизмах синтеза не только абаецина, но и апидаецина, высказываются лишь предположения, что их предшественником может быть антимикробный пептид диптерицин, который встречается в личинках *Phormia regina*, но не встречается в во взрослых формах. Об этом также свидетельствует близкий аминокислотный состав и намного большая масса диптерицина, однако кардинальное различие в скорости действия апидаецина и двух остальных AMP, а также различия к требованиям внешней среды, разная антимикробная активность и направленность, временные различия в синтезе опровергают теорию о литическом происхождении.

3. Гименоптаецин состоит из 93 аминокислот, с N-конца имеется

модифицированная 5-пирролидон-5-карбоксилловая аминокислота, 10% аминокислот — глицин. Суммарный заряд молекулы равен +5, что позволяет отнести этот пептид к катионным АМП. Гименоптаецин активен против ряда грамотрицательных и небольшого количества грамположительных микроорганизмов, в том числе и тех, что устойчивы к действию апидаецина, однако минимальная ингибирующая концентрация этого пептида намного выше, чем у апидаецина (5-50 мкг/мл против 0,02-0,5 мкг/мл). В исследовании с *E. coli* было выяснено, что антибактериальное действие гименоптаецина связано с внутренней мембраной бактерий, однако в точности ещё не известно, каким образом [22]. Пептид сохраняет антибактериальную активность при относительно слабой ионной силе, близкой к физиологическим значениям в гемолимфе пчёл. По своей вторичной структуре гименоптаецин не является спиральным АМП, то есть не формирует в мембранах бактерий неконтролируемые поры, однако иного механизма действия до сих пор не предложено.

4. Пчелиный дефензин и роялизин. Два антимикробных пептида с массой около 5,5 кДа, отличающиеся лишь одной аминокислотой (тирозин роялизина заменён на аргинин в дефензине). Кроме того, роялизин идентифицируется в маточном молочке [30], а дефензин — в гемолимфе [20]. Дефензин, как и остальные пептиды этого класса, имеет такую же структуру: на С-конце присутствует α -спиральная структура, что облегчает его взаимодействие с бактериальной мембраной для её разрушения, однако сама молекула β -складчатая; внутри молекулы есть дисульфидные мостики. Оба пептида активны в отношении грамположительных лактобацилл, стафилококка, различных стрептококков. Отмечено также, что воздействие микроволновым излучением негативно влияет на антибактериальную активность пчелиного дефензина [19].

* * *

Основываясь на всех вышеперечисленных фактах можно сделать вывод, что в мёде могут быть идентифицированы белковые агенты, имеющие сильные антимикробные свойства, не вызывающие резистентность бактерий, безопасные для человека, обладающие комплексным действием, что позволит применять препараты на основе этих веществ не только как антибактериальные препараты, но и как иммуномодуляторы, препараты для заживления ран и лечения кожных заболеваний. Уже сейчас ведутся разработки подобных препаратов из роялизина [18].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Приготовление раствора мёда, ультрафильтрация

В качестве исследуемого материала выступал мёд, собранный не более года назад. Образец хранился в плотно закрытой стеклянной таре в тёмном месте при комнатной температуре. Каждый раз при отборе образца оценивался его внешний вид и запах, никаких посторонних загрязнений, включений, расслоения выявлено не было.

Приготовление рабочего раствора мёда производилось следующим образом: 50 г. мёда растворял в 0,1 литре воды и фильтровал сначала через ватный фильтр для удаления крупных механических элементов, а затем через фильтр «красная лента» на воронке Бухнера (под вакуумом). Полученный 50%-й раствор для концентрирования и разделения на фракции с содержанием >5 кДа и <5 кДа фильтровал на подготовленной следующим образом ультрафильтрационной установке MasterFlex с мембраной Vivaflow:

1. первоначальная промывка мембраны от загрязнителей и консервантов дистиллированной водой (0,5-1 объёмов исходного резервуара);
2. промывка 0,5 н раствором NaOH для омыления неотмывшихся загрязнителей (0,5-1 объёмов исходного резервуара);
3. вторичная промывка мембраны от раствора щёлочи и оставшихся загрязнителей тем же объёмом дистиллированной воды.

Полученный концентрированный фильтрат хранился в плотно закрытой стеклянной таре в морозильной камере и использовался для дальнейшего анализа. После фильтрации мембранный блок очищался по той же схеме, что и перед использованием.

Используемый принцип ультрафильтрации на установке Vivaflow называется фильтрацией в тангенциальном потоке. Принципиальная схема установки представлена на рисунке 2.

Исходный раствор из резервуара 1 поступает под действием давления,

создаваемого перистальтическим насосом 2, в мембрану 3. Под давлением происходит разделение частиц раствора; молекулы с массой большей 5 кДа (зависит от параметров полупроницаемого мембранного блока) не проходят через мембрану и возвращаются обратно в резервуар 1, а молекулы меньшей массы проходят через мембрану и проходят в резервуар 5.

Использование принципа тангенциального потока жидкости позволяет использовать мембраны для ультра- и нанофильтрации многократно, каждый проводя параллельно с разделением веществ и очистку самой мембраны. Достигается это тем, что ток жидкости, создаваемый перистальтическим насосом, омывает поверхность мембраны со стороны резервуара 1 и очищает её от не прошедших по размеру в поры молекул.

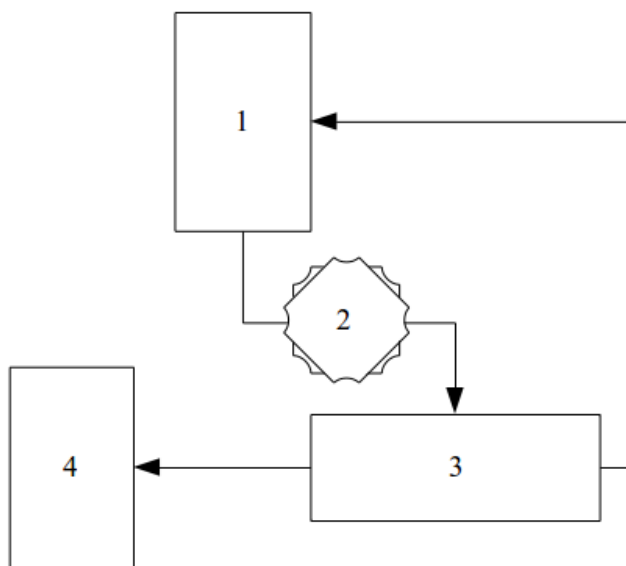


Рисунок 2. Схема ультрафильтрационной установки Vivaflow (цифрами обозначены: 1 — первый резервуар, 2 — перистальтический насос, 3 — мембрана с определённой селективностью, 5 — второй резервуар)

Вместе с параллельными процессами очистки мембраны и фильтрации метод тангенциального потока позволяет концентрировать фильтруемые растворы. Эффект концентрирования достигается за счёт малого, но постоянного оттока растворителя, таким образом достигается отток молекул

растворителя, потеря целевых частиц с массой, большей 5 кДа, минимальна.

2.2 Очистка белков и пептидов раствора мёда от углеводов, их разделение ионообменной хроматографией

В качестве матрицы для ионообменной хроматографии использовалась DEAE-целлюлоза — крупнопористый и слабый анионообменник, который широко используется для хроматографии белков и олигонуклеотидов. Т. к. изначально ионообменник представляет собой белый сухой мелкозернистый порошок, то необходимо провести его преформирование и промывку. Преформирование — необходимая процедура подготовки ионообменников на основе целлюлозы, которые хранятся в сухом виде. Эта необходимость объясняется тем, что при хранении в сухом виде (или просто высушивании) между гранулами и нитями целлюлозы образуются дополнительные водородные связи, которые мешают эффективной развёртке ионогенных групп, что, естественно, затрудняет сорбцию на них разделяемых веществ.

Навеску массой 3 г заливают большим количеством дистиллированной воды и оставляют на сутки для набухания. Т. к. степень набухания DEAE-целлюлозы небольшая, не следует ожидать заметного увеличения объёма. После 24 ч. набухания следует несколько раз взмутить ионообменник и дать осесть гранулам целлюлозы. Неосевшие частицы, обломки гранул и другой мусор необходимо удалить декантацией, налить свежей дистиллированной воды, дать отстояться и снова слить. Эта процедура повторяется не менее трёх раз и до тех пор, пока поверхность не будет свободна от видимых загрязнений. Преформирование проводят следующим образом: набухшие гранулы взмучивают и дают осесть на дно сосуда, удаляют верхний слой жидкости как можно максимально и на 45-60 мин заливают 0,5 М раствором HCl для полной ионизации ионогенных групп. Затем масса ионообменника осторожно промывается (либо на фильтре, либо путём нескольких циклов взмучивания–декантации и добавления воды) до pH ~ 4. Промывать до

нейтральных значений не стоит, иначе ионы OH^- будут постепенно заменять ионы Cl^- в ионогенных группах, что может сильно увеличить время промывки, потому что будет происходить обратное закисление раствора. Следующий шаг: заменить ионы Cl^- на исходные OH^- путём замачивания в 0,5 М растворе NaOH на 45-60 минут. После этого следует снова промыть ионообменник, но уже до нейтральных значений pH, закисления или защелачивания промываемой воды происходить не будет.

Используемая колонка была стеклянной, диаметр 1,75 см, объём носителя — 6,5 мл. На дно колонки помещался кружок фильтровальной бумаги для предотвращения вытекания сорбента, после чего, постепенно и в несколько этапов, заливалась предварительно взмученная DEAE-целлюлоза. Для предотвращения образования перепадов плотности сорбента каждый раз слой осевших частиц перед заливкой новой порции суспензии носителя взмучивался. После достижения необходимого объёма сорбента столб осевших частиц взмучивается последний раз и после оседания частиц на поверхность сорбента наносился кружок фильтровальной бумаги для предотвращения возможного возникновения колебания уровня осевших частиц при нанесении образца. После всех вышеописанных процедур колонка уравнивалась, для чего её промывали тем буферным раствором, которым велась элюция на первом этапе (буферный раствор трис-HCl концентрации 0,2 М с pH = 9). Т. к. уравнивание — процесс довольно длительный, то для этого был использован примерно десятикратный объём колонки начального буферного раствора. После всех подготовительных операций проводилось хроматографирование с использованием следующих буферных растворов: 0,2 М трис-HCl (pH = 9) и 0,2 М Na-цитратный (pH = 6). Фракции собирались объёмом 2 мл, буфер менялся после восьмой фракции. После сбора фракций колонка уравнивалась исходным буфером, плотно закрывалась пробкой для предотвращения закисления угольной кислотой, которая образуется из CO_2 воздуха и протонов буфера, и хранилась в холодильной камере.

Содержание белка во фракциях определяли спектрофотометрически на длине волны $\lambda = 280$ нм, содержание углеводов — реакцией Селиванова.

2.3 Спектрофотометрическое определение концентрации белков

Спектрофотометрическое определение концентрации белков путём измерения поглощения на длине волны $\lambda = 280$ нм основано на том, что входящие в состав многих белков и пептидов ароматические аминокислоты триптофан и тирозин поглощают на длинах волн 279 нм и 274 нм соответственно. Вклад в общее поглощение фенилаланина сравнительно мал.

Для измерения концентрации исследуемый раствор помещался в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и измерялось оптическое поглощение на длине волны $\lambda = 280$ нм против контроля (чистый растворитель). По полученным значениям был построен профиль элюции белков после проведения хроматографии. Также показатели поглощения использовались для определения концентрации с помощью метода калибровочной кривой в пределах концентраций от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, используемый стандарт белка — бычий сывороточный альбумин.

2.4 Определение углеводов реакцией Селиванова

В качестве реакции для определения наличия углеводов в пробе использовалась реакция Селиванова. Данная реакция является качественной только для фруктозы или других кетоз (скорость реакции альдоз намного ниже, чем с кетозами), которые являются маркерами наличия углеводов в пробе. Реакция основана на образовании фруктозы с крепкой соляной (или другой минеральной) кислотой оксиметилфурфурола, который с резорцином даёт вишнёво-красное окрашивание.

Из каждой фракции после ионообменной хроматографии отбиралась аликвота объёмом 0,5 мл, к которой добавлялся 0,1%-й спиртовой раствор

резорцина в количестве 0,5 мл и 1,5 мл 30% HCl, после чего смесь ставилась в кипящую водяную баню для инкубации на 8 минут. Интенсивность окраски измерялась на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете толщиной 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 490$ нм. По полученным значениям оптической плотности был составлен график.

2.5 Концентрирование и очистка раствора белков и пептидов от буферного раствора гель–фильтрацией

Концентрирование раствора белков и пептидов после ионообменной хроматографии проводилось методом выпаривания. Фракции с очищенными от углеводов белками и пептидами после нескольких ионообменных хроматографий сливались в один стеклянный бюкс, который ставили в суховоздушный термостат при температуре 40 °С до полного испарения, после чего сухой остаток перерастворялся в 1 мл дистиллированной воды. Аналогичным методом приготавливался конечный препарат белков и пептидов мёда. Собранные после гель–фильтрации фракции, в которых были обнаружены белковые молекулы, сливались в бюкс и ставились в термостат до полного испарения. Сухой остаток перерастворялся водой до конечной концентрации белка в 100 мкг/мл.

Обессоливание раствора белков и пептидов после ионообменной хроматографии проводилось с помощью гель–фильтрации. Этот метод основан на том, что молекулы разных размеров и масс, проходя в токе элюента через столб пористого носителя, разделяются из-за разности в подвижности. Носитель представляет собой химически модифицированный декстран — сефадекс, гранулы которого имеют поры определённого размера. Молекулы малого размера и массы, элюируясь подвижной фазой через носитель, проходят не только между гранулами, но и через них, поэтому суммарно их путь будет больше, чем у молекул большей массы, не заходящих в поры носителя.

Обессоливание проводилось на колонке с сефадексом G-25, диаметр колонки 7 мм, объём носителя — 14 мл. Подготовка носителя проводилась по следующей схеме: 2 г сухого порошка сефадекса заливались дистиллированной водой для набухания на 4-5 часов, после чего несколькими циклами взмучивания и декантации проводилось удаление неосевших частиц, обломков гранул и другого мусора. Набухший чистый гель заливался в колонку, на дне которой была уложена фильтровальная бумага для предотвращения потери геля. Заполнение колонки проводилось при постоянном токе элюента, преждевременное осаждение всего геля в колонке не допускалось для предотвращения резких колебаний плотности носителя. После достижения нужного объёма геля заполнение прекращалось, скорость прихода и расхода элюента уравнивалась, и колонка промывалась длительное время для уравнивания. После уравнивания сверху на столб геля помещался диск фильтровальной бумаги для исключения колебания уровня геля при элюировании или нанесении образца.

Образец наносился после того, как столб элюента уменьшится до такого объёма, что его почти не будет заметно, но чтобы гель был полностью залит им. Сверху аккуратно наслаивалась разделяемая проба — 1 мл концентрированного раствора, содержащего белки и пептиды, а также натриевую соль лимонной кислоты и саму кислоту. После диффузионного впитывания пробы в столб геля начиналась элюция дистиллированной водой, фракции собирались по 2 мл. По завершении элюции колонка длительное время промывалась дистиллированной водой и убиралась на хранение в холодильную камеру.

Определение содержания белковых молекул проводилось спектрофотометрическим методом путём измерения поглощения на длине волны $\lambda = 280$, определение содержания цитрат-иона определялось осаждением с хлоридом кальция.

2.6 Определение содержания цитрат–иона осаждением с хлоридом кальция

Метод основан на реакции осаждения цитрат–иона хлоридом кальция после нагревания.

Для определения содержания цитрат–иона во фракции после гель–филтрации отбиралась аликвота в 0,5 мл, в пробирку прибавлялся равный объём 2 М раствора CaCl_2 , проба ставилась в кипящую водяную баню на 10 минут. О наличии в пробе цитрат–иона судили по образованию белого нерастворимого в воде осадка цитрата кальция.

2.7 Тестирование раствора белков и пептидов на антибактериальную активность диско–диффузионным методом

Принцип метода заключается в помещении на только что посеянную питательную агаровую среду носителя с тестируемым веществом. С носителя (диски фильтровальной бумаги или ткани) постепенно происходит диффузия внутрь среды и по её поверхности, что влияет на рост культуры вокруг в определённом радиусе. Для контроля используются диски с антибиотиком.

Исследование проводилось на культурах *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecalis*. На диски из полиэфирного волокна диаметром 6 мм наносился препарат белков и пептидов в объёме 5 мкл, очищенный от буфера гель–филтрацией, в концентрации 50 и 100 мкг/мл. Для каждой концентрации осуществлялось две повторности по 10 дисков (всего 40). Диски помещались на среду, засеянную штаммом микроорганизмов. После разрастания культуры оценивался радиус круга вокруг диска с препаратом в сравнении с диском, на который был нанесён ванкомицин и амикоцин в концентрациях 5 и 30 мкг/мл соответственно (объём 5 мкл).

2.8 Анализ белково–пептидного спектра препарата белков и пептидов мёда с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

В основе принципа высокоэффективной жидкостной хроматографии лежит разная способность веществ под действием жидкого растворителя продвигаться через фронт неподвижной фазы. При этом вещества разделяются в зависимости от размера молекулы и её массы вследствие многочисленных Ван–дер–Ваальсовых взаимодействий между разделяемыми молекулами и молекулами носителя. Отличительная особенность ВЭЖХ — разделение происходит под большим давлением (десятки и сотни атмосфер) с потоком элюента постоянной силы.

Для разделения пептидов используют самый распространённый и удобный вариант ВЭЖХ — обращённо–фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ–ВЭЖХ), когда подвижная фаза является полярной смесью воды и органического растворителя, а неподвижная — неполярная (гидрофобный силикагель с пришитыми алкильными группами длиной C4, C8, C18 и т. п.)

Хроматографирование проводилось на жидкостном хроматографе фирмы Bio–Rad модели NGC–Quest с петлевым автоматическим вводом пробы и спектрофотометрическим детектором, работающего в областях ультрафиолетового и видимого излучения. Для разделения использовалась колонка размеров 150x4,6 мм, размер частиц — 5 мкм, наполнитель — силикагель C18. В качестве буфера А использовалась смесь дистиллированной воды и ортофосфорной кислоты (объёмная смесь 0,1% ортофосфорной кислоты и воды), буфер Б — смесь ацетонитрила качеством для ВЭЖХ и ортофосфорной кислоты (соотношение частей то же). Объём пробы составлял 50 мкл, разделение проводилось при различных условиях элюирования (как изократическом, так и градиентном) при комнатной температуре, детектирование велось на следующих длинах волн: 215 и

220 нм — чувствительный метод обнаружения пептидных связей, 260 и 280 нм — обнаружение ароматических аминокислот и нуклеиновых кислот для дополнительной проверки.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Очистка от углеводов и разделение белков и пептидов методом ионообменной хроматографии

Для препаративной очистки белков и пептидов мёда от углеводов сначала определялся достаточный наносимый объём раствора мёда, чтобы конечный выход белковых продуктов был оптимален. Для этого, не изменяя параметров колонки, проводили хроматографию с объёмом пробы 0,75, 0,5 и 0,35 мл. Профили элюции показаны на рисунках 3, 4 и 5.

Опытным путём было установлено, что при объёме наносимой пробы в 0,75 мл выход белков и пептидов после очистки слишком мал для дальнейших анализов, в то время как количество не связавшихся с обменником белковых молекул велико. Оптимальным признан объём в 0,5 мл, когда наблюдается относительное равенство связавшихся и не связавшихся белков и пептидов, а при объёме 0,35 мл выход белков слишком мал.

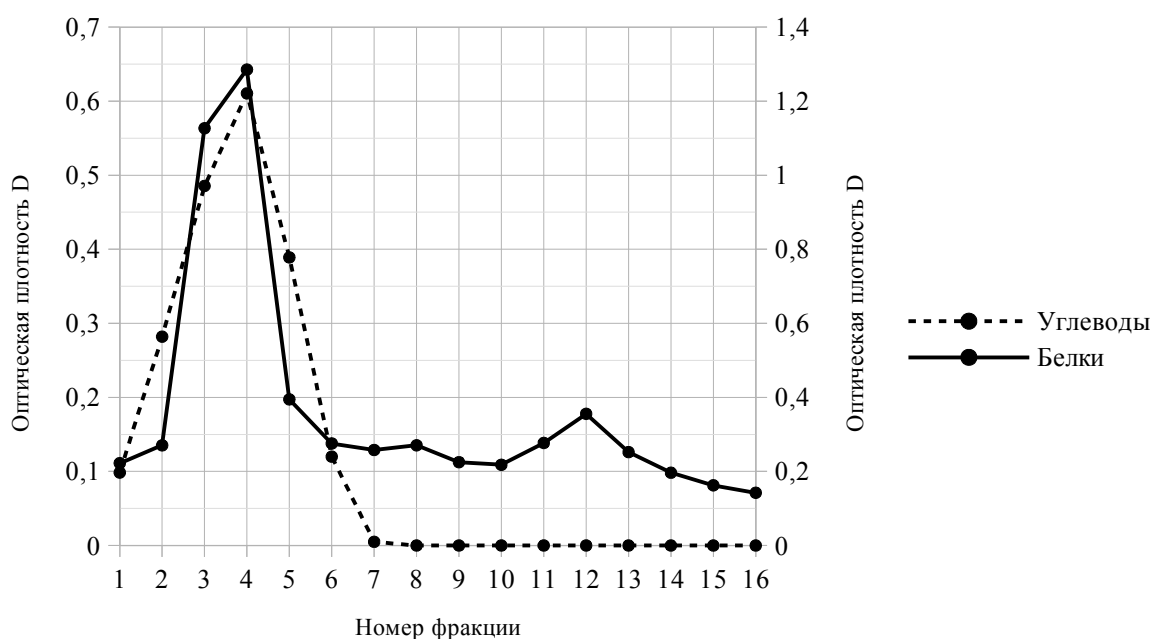


Рисунок 3. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,75 мл по оптической плотности

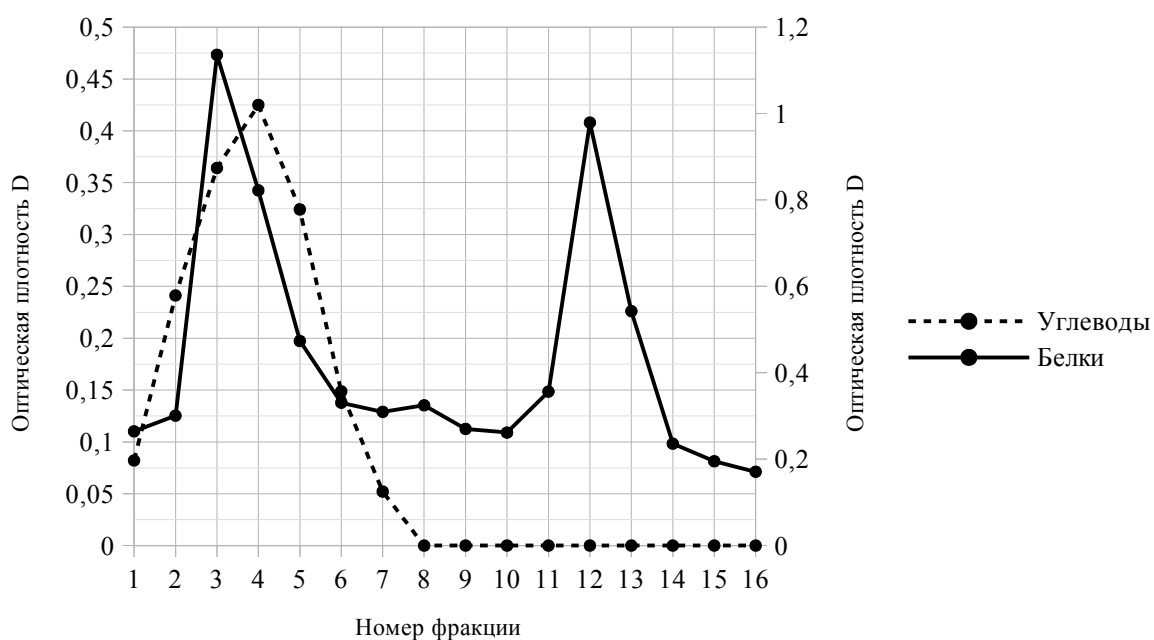


Рисунок 4. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,5 мл по оптической плотности

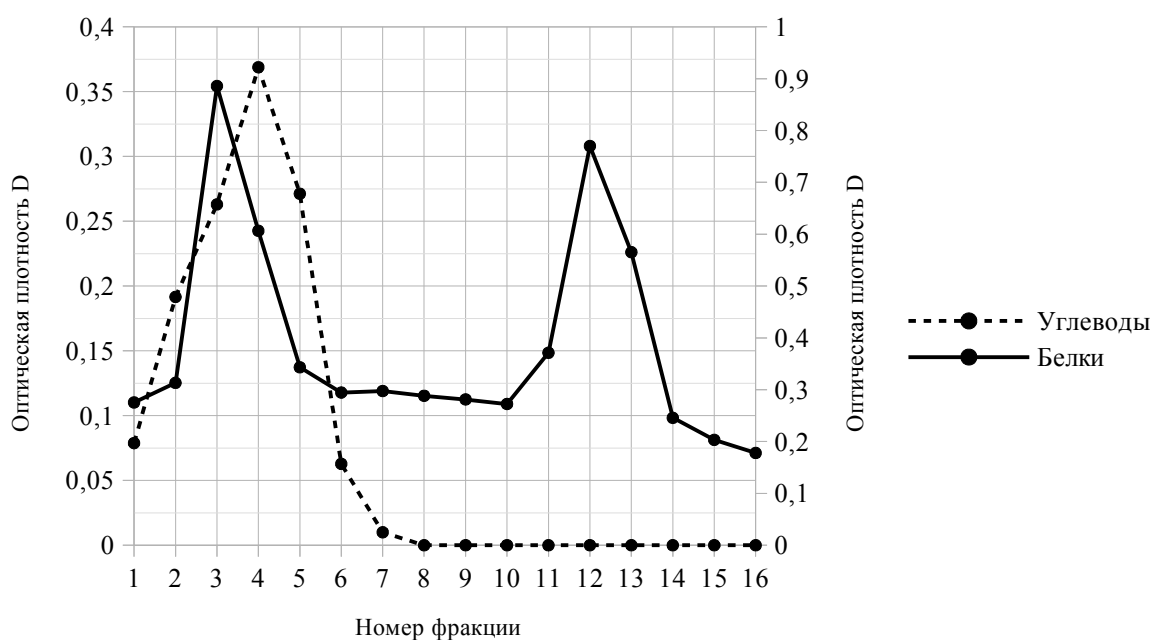


Рисунок 5. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,35 мл по оптической плотности

По значениям оптических плотностей с помощью калибровочной кривой были рассчитаны концентрации белка в каждой фракции для количественного определения выхода белков и пептидов мёда после очистки

от углеводов методом ионообменной хроматографии. Профили элюции по концентрации представлены на рисунках 6, 7 и 8.

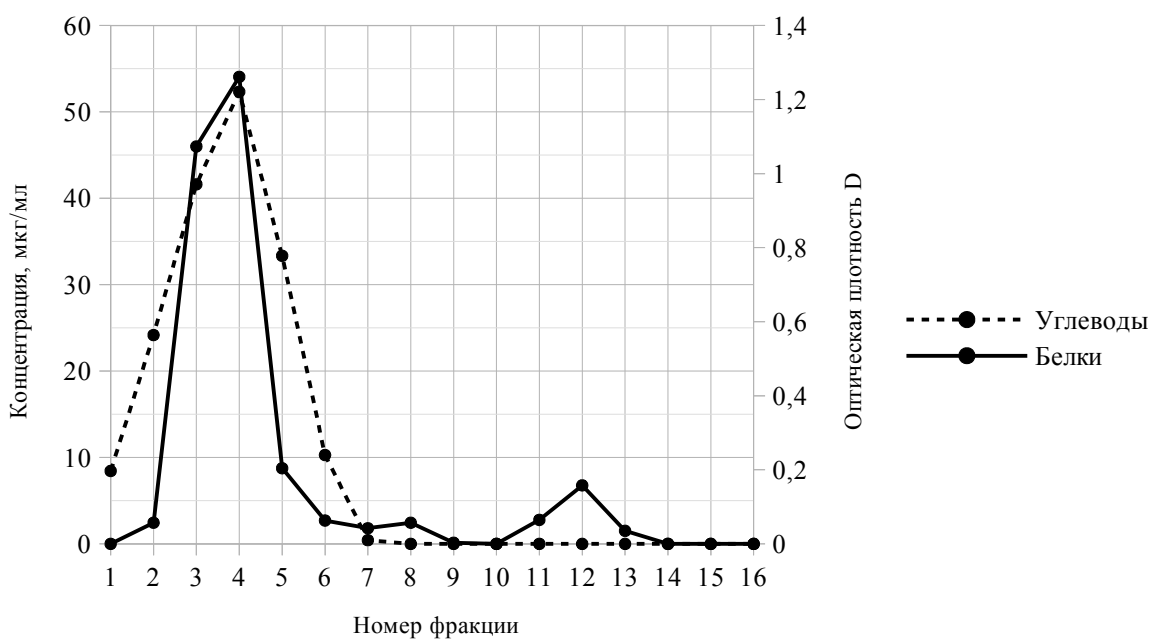


Рисунок 6. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,75 мл по концентрации белка

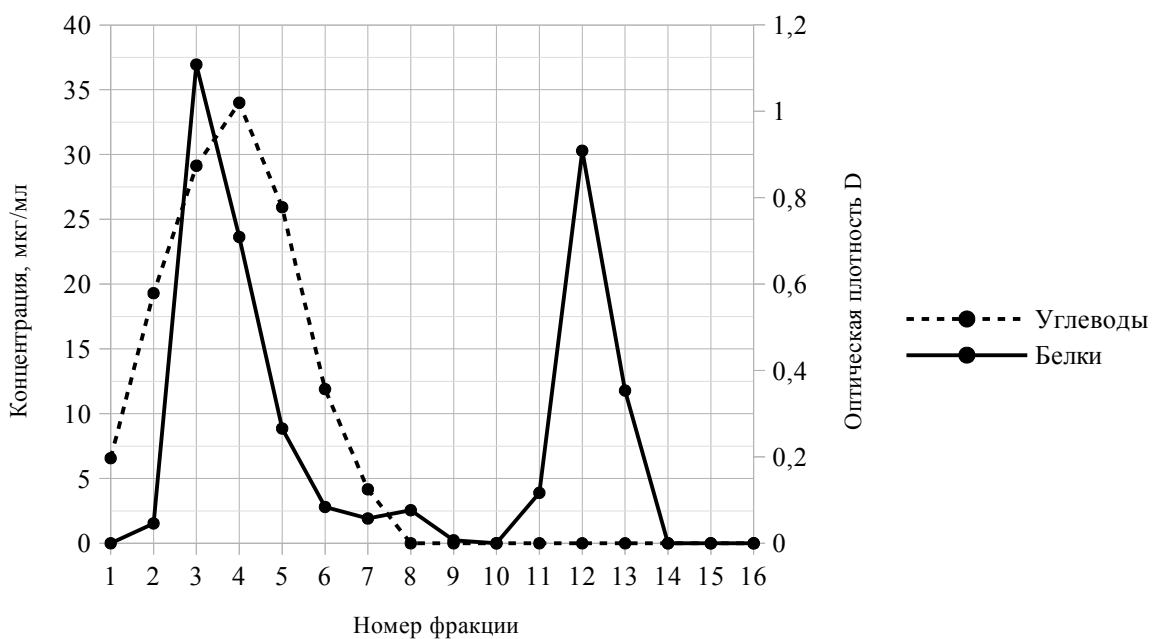


Рисунок 7. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,5 мл по концентрации белка

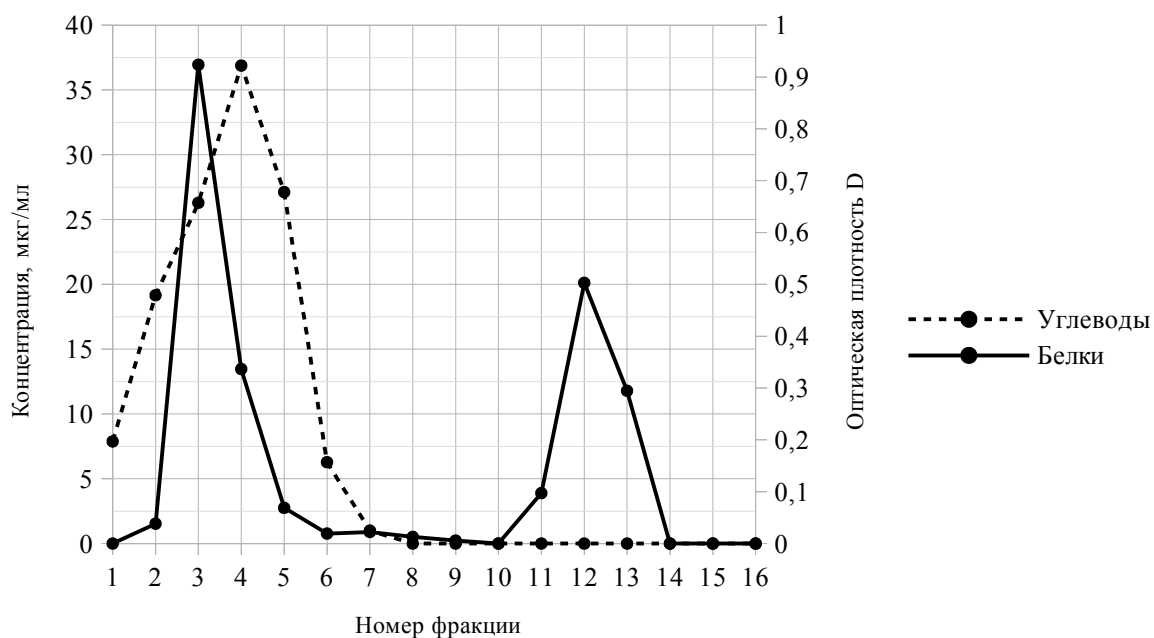


Рисунок 8. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,35 мл по концентрации белка

Таким образом экспериментально установлено, что оптимальный объём наносимой пробы — 0,5 мл. Предполагается, что выход очищенных белковых веществ зависит от концентрации углеводов (большое количество молекул сахаров мешает электростатическому взаимодействию белков и функциональных групп носителя), а также от количества носителя, ведь количество ионных групп для связывания лимитировано.

Определение выхода белковых продуктов после хроматографии определялось как по оптической плотности, так и по концентрации, которая высчитывалась методом калибровочной кривой, построенной по кратным разведениям БСА. Дальнейшая очистка белков и пептидов от углеводов проводилась при неизменных параметрах хроматографической системы: высота столба ионообменника 6,5 см, диаметр колонки 1,75 см, элюирование начальным буфером (0,2 М трис-НСl, рН = 9) для сбора первых 8 фракций, элюирование вторым буфером (0,2 М Na-цитратный, рН = 6) для десорбции закрепившихся белков фракции с 9 по 16. Наличие углеводов в пробах определялось реакцией Селиванова, концентрация белков —

спектрофотометрически на длине волны $\lambda = 280$ нм.

3.2 Удаление солей буфера из концентрированной смеси белков и пептидов, построение калибровочной кривой и приготовление конечного раствора очищенных белков и пептидов мёда

После проведения определённого количества раз ионообменной хроматографии фракции, в которых было обнаружено содержание белковых веществ, но не обнаружено содержание углеводов, сливались в бюкс и помещались в суховоздушный термостат при температуре 40 °С для удаления растворителя. После окончательного испарения воды смесь белков и пептидов мёда представляет собой порошок в смеси с кристаллами цитрата натрия. Для получения чистого раствора необходимо было провести обессоливание.

Для очистки использовался метод гель-фильтрации. Через колонку, заполненную сефадексом G-25, пропусклся перерастворённый в 1 мл дистиллированной воды высушенный сухой осадок. Элюция проводилась дистиллированной водой, фракции собирались по 2 мл. Определение содержания белка проводилось спектрофотометрическим методом измерения поглощения на длине волны $\lambda = 280$ нм, наличие во фракции цитрат-иона — качественной реакцией осаждения с CaCl_2 . В итоге был построен график, отражающий зависимость оптической плотности раствора от номера фракции (рис. 9). По значениям оптической плотности с помощью калибровочной кривой была рассчитана абсолютная концентрация белковых молекул в мкг/мл (рис. 10).

Для построения калибровочной кривой были приготовлены последовательные разведения водного раствора БСА в трёх повторностях с концентрациями в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мкг/мл, после чего была измерена оптическая плотность проб на длине волны $\lambda = 280$ нм. По результатам измерений была построена калибровочная кривая, вычислена

дисперсия для каждого показания, построена прямая методом регрессионного анализа и получено её уравнение для аналитического расчёта концентраций белков и пептидов (рис. 11).

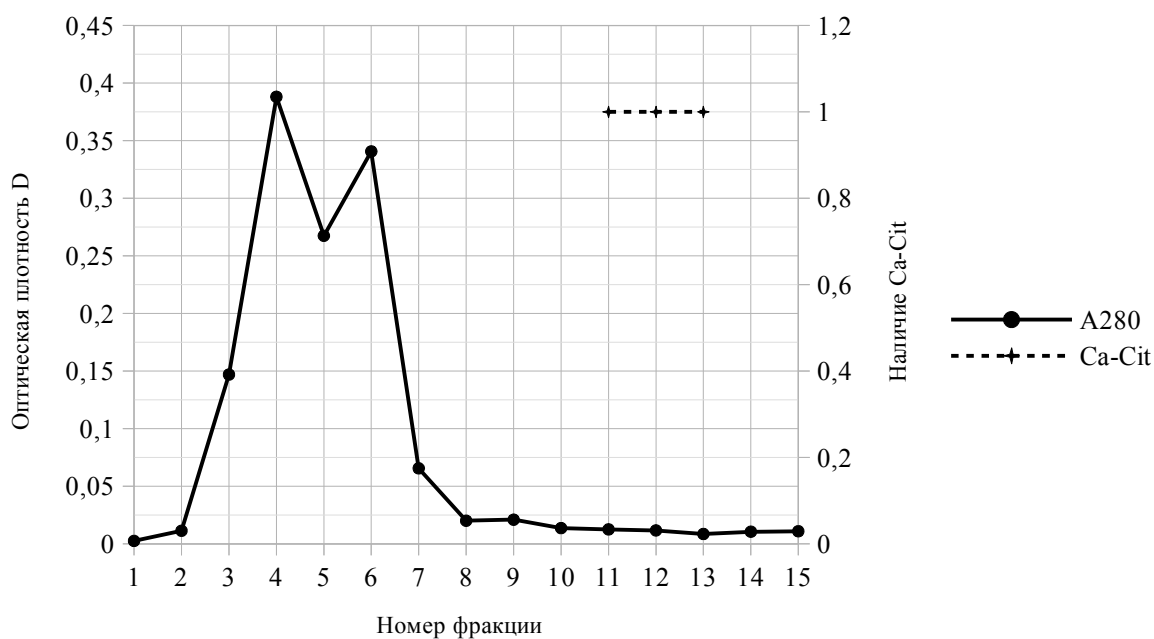


Рисунок 9. График зависимости оптической плотности раствора при длине волны $\lambda = 280$ нм от номера фракции при обессоливании (указано также наличие цитрата)

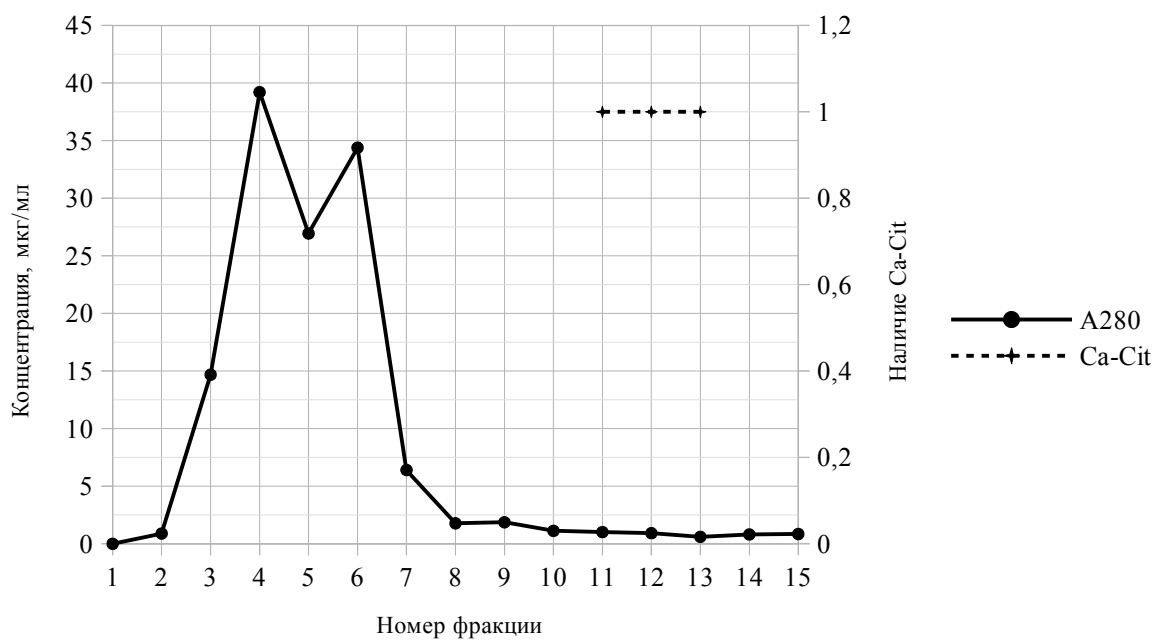


Рисунок 10. График зависимости концентрации белка от номера фракции при обессоливании (указано также наличие цитрата)

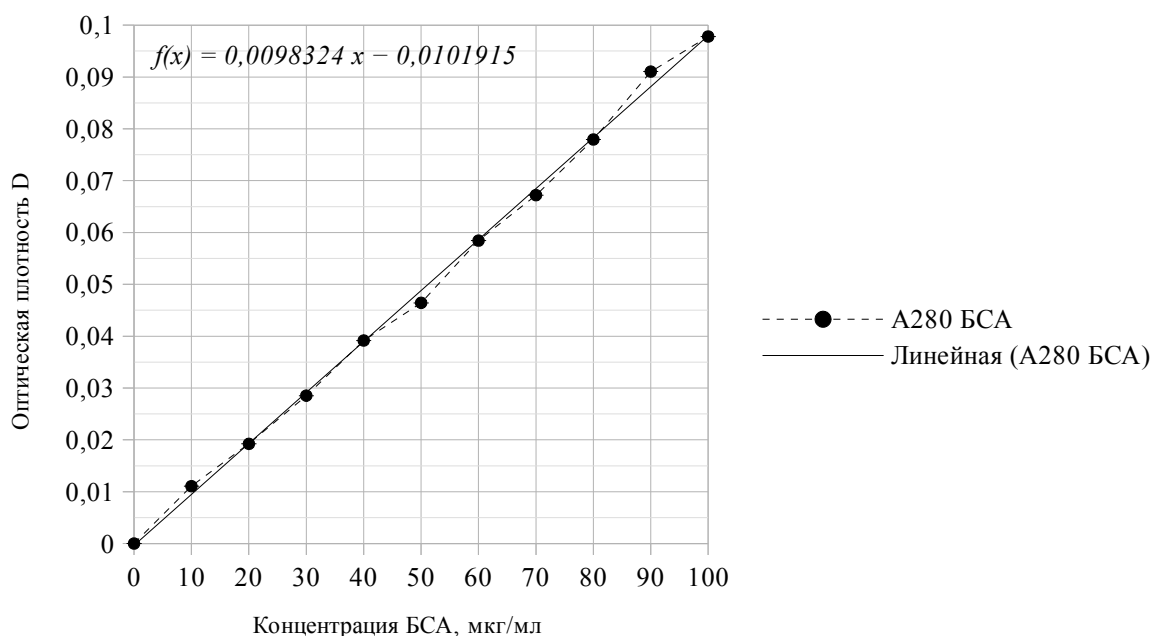


Рисунок 11. Калибровочная кривая, построенная по значениям поглощения разведений БСА на длине волны $\lambda = 280$ нм

Как видно из профилей элюции, белки и пептиды выходят в свободном объёме колонки, как молекулы сравнительно большой массы (как минимум больше 5 кДа), в то время как молекулы цитрат-иона выходят значительно позднее из-за малой массы.

После анализа результатов элюции белков гель-фильтрации можно сказать, что в смеси находится две группы трудноразделяемых в условиях проводившейся хроматографии белковых веществ. Не исключено, что эти две группы составляют более гетерогенные по своей структуре и составу белковые соединения, чем может показаться.

Для концентрирования путём выпаривания и последующего перерастворения были отобраны фракции с максимальным содержанием белков — 3, 4, 5 и 6. Содержимое фракций было слито в один бюкс, который поместили в суховоздушный термостат при 40 °С до полного испарения воды. Сухой остаток после выпаривания представлял собой белый порошок, который перерастворили в таком объёме дистиллированной воды, что конечная концентрация раствора составила 100 мкг/мл.

3.3 Анализ препарата белков и пептидов методом ВЭЖХ

Анализ препарата белков и пептидов проводили методом обращённо-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке с силикагелем C18 (размер частиц 3 мкм, размер колонки — 150x4,6 мм), хроматограф модели NGC-Quest фирмы Bio-Rad. Объём пробы в 50 мкл с концентрациями в 100 и 400 мкг/мл разделялся при различных условиях элюирования, но при неизменном составе подвижных фаз (0,1% ортофосфорная кислота в воде или ацетонитриле). Хроматограммы разделений белков и пептидов представлены на рисунках с 12 по 18.

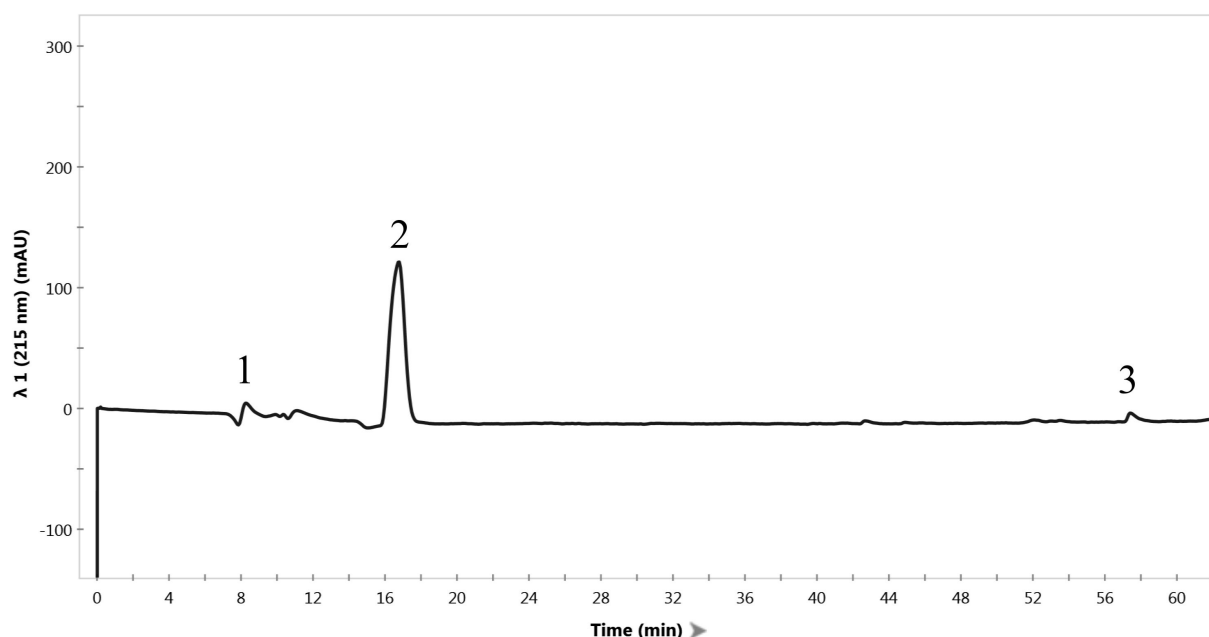


Рисунок 12. Хроматограмма разделения смеси белков и пептидов в концентрации 100 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%, измерение на длине волны $\lambda = 215$ нм

Анализ хроматограммы разделения смеси белков и пептидов в концентрации 100 мкг/мл в градиенте буфера В от 0 до 100% показывает, что в смесь можно разделить на три неравных компонента, которые соответствуют пикам 1, 2, и 3 на рис. 12. Параметры пиков представлены в таблице 1, в которую включены следующие значения:

- номер пика;
- время удерживания, мин — один из основных параметров пика, качественно характеризующий вещество по его способности задерживаться на колонке;
- высота пика, mAU — максимальная величина оптической плотности на вершине пика, отражающая количество вещества;
- абсолютная площадь, мл*mAU — количественный показатель, отражающий абсолютную концентрацию вещества;
- относительная площадь, % — количественный параметр, с помощью которого можно вычислить абсолютную концентрацию вещества, зная исходное общее количество вещества в пробе.

Таблица 1 — Параметры пиков на длине волны $\lambda = 215$ нм при разделении смеси в концентрации 100 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%

№ пик а	Время удерживания, мин	Высота пика, mAU	Абсолютная площадь, мл*mAU	Относительная площадь, %
1	8,27	4,46	0,38	1,22
2	16,77	121,56	30,69	97,82
3	57,41	6,23	0,93	1,71

Представленные параметры показывают, что в смеси находится три различных компонента в неравной концентрации, что противоречит данным, полученным после обессоливания гель-фильтрацией (рис. 9 и 10), когда даже при низкой разрешающей способности колонки для обессоливания произошло начальное разделение смеси на два компонента (об этом свидетельствует раздвоение вершины пика).

На рис. 13 изображена хроматограмма разделения пробы смеси белков и пептидов мёда в концентрации 400 мкг/мл. Заметно, что пик № 2 с рис. 12 с повышением концентрации раздваивается у вершины, что может свидетельствовать о том, что либо в текущих условиях разделения в этом

объёме элюции выходит смесь белков и пептидов, которую трудно разделить окончательно, либо раздвоение пика является методической ошибкой, вызванной неравномерностью элюции или внутренним дефектом колонки. Дальнейшее проведение хроматографирования не исключает ни первый вариант, ни второй из-за различий во времени удерживания пиков.

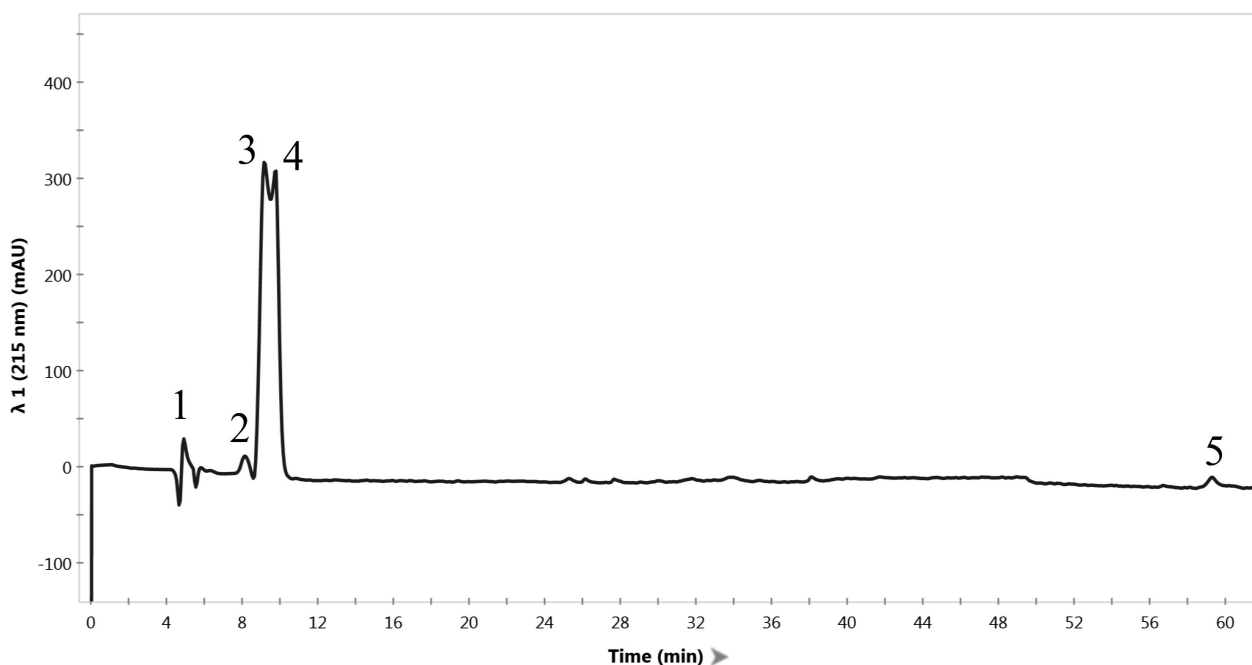


Рисунок 13. Хроматограмма разделения смеси белков и пептидов в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%

Таблица 2 — Параметры пиков на длине волны $\lambda = 215$ нм при разделении смеси в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%

№ пика	Время удерживания, мин	Высота пика, mAU	Абсолютная площадь, мл*mAU	Относительная площадь, %
1	4,92	28,99	4,34	2,2
2	8,14	11,09	2,09	1,06
3	9,18	318,18	109,01	55,21
4	9,77	310,73	81,92	41,49
5	59,31	9,12	2,6	0,78

Появление на хроматограмме новых пиков, большинство из которых минорные, свидетельствует о том, что с повышением концентрации препарата в пробе оказывается и большее количество белков и пептидов, что позволяет части молекул, количество которых было минимально и не позволяло эффективно детектировать их при концентрации 100 мкг/мл, выйти из колонки и обнаружить себя. В целом, при концентрации 400 мкг/мл наблюдается такая же картина, как и на рис. 12 — подавляющее большинство белков и пептидов выходит одной группой, не разделяясь, на участке градиентной элюции.

Примечательно, что в процессе элюции практически нет пиков поглощения на длине волны 280 нм, однако определение количества белка на предыдущих стадиях очистки велось именно по поглощению на этой длине волны. На рис.14 представлена хроматограмма, аналогичная рис.13, с дополнительным профилем элюции по поглощению на 280 нм (толстая линия). Видно, что выход поглощающих веществ на этой длине волны наблюдается только на месте пика № 1 с рис. 13, при этом параметры пиков одинаковы, т. е. можно сделать вывод, что элюция на одном лишь градиенте буфера В не позволяет эффективно разделить смесь белков и пептидов, потому что величина оптической плотности на данной длине волны у данного, единственного, пика не соответствует предыдущим данным. По этой причине было принято решение изменить условия хроматографирования: увеличить время элюции на изократическом режиме буфера В 100%, хроматограмма такого разделения представлена на рис. 15.

Как видно на рисунке 15, изменение условий элюции приводит к более эффективному разделению препарата белков и пептидов мёда: в смеси можно идентифицировать как минимум 10 индивидуальных компонентов, обладающих различной молекулярной массой (об этом свидетельствует значительная разница во времени удерживания большинства пиков). Параметры некоторых пиков приведены в таблице 2 (расчёт значений площадей и высот некоторых пиков затруднён из-за искривления базовой

линии на участке изократической элюции).

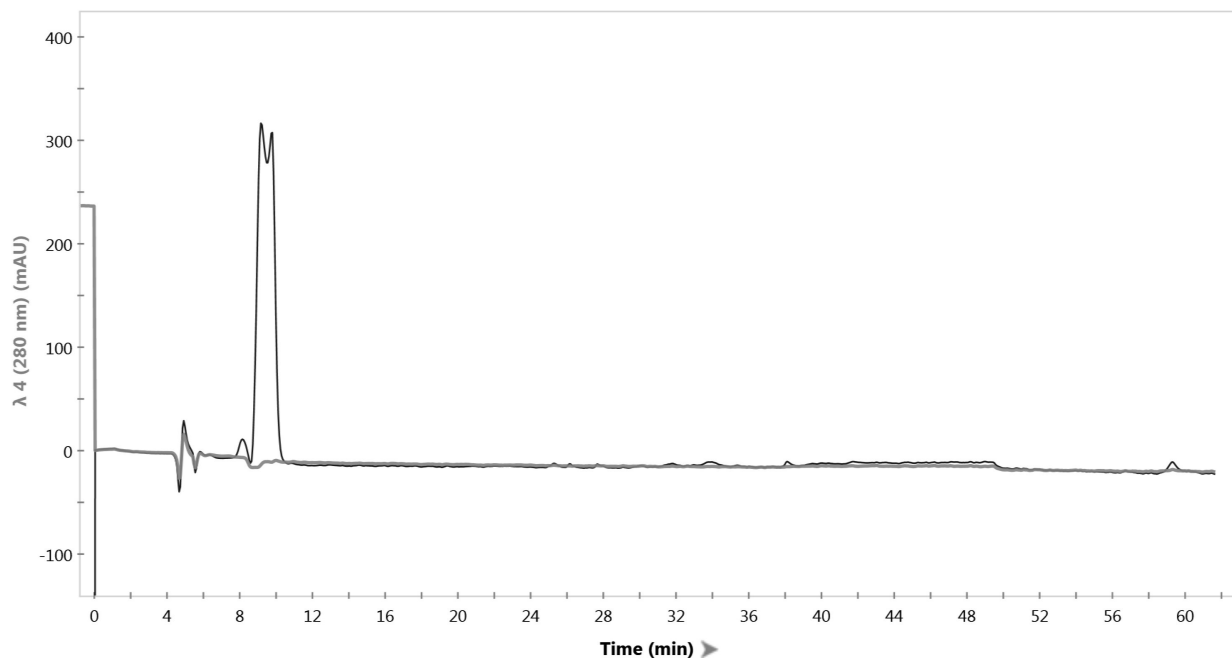


Рисунок 14. Хроматограмма разделения смеси белков и пептидов в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%, измерение на длинах волн $\lambda = 215$ нм (тонкая линия) и 280 нм (жирная серая линия)

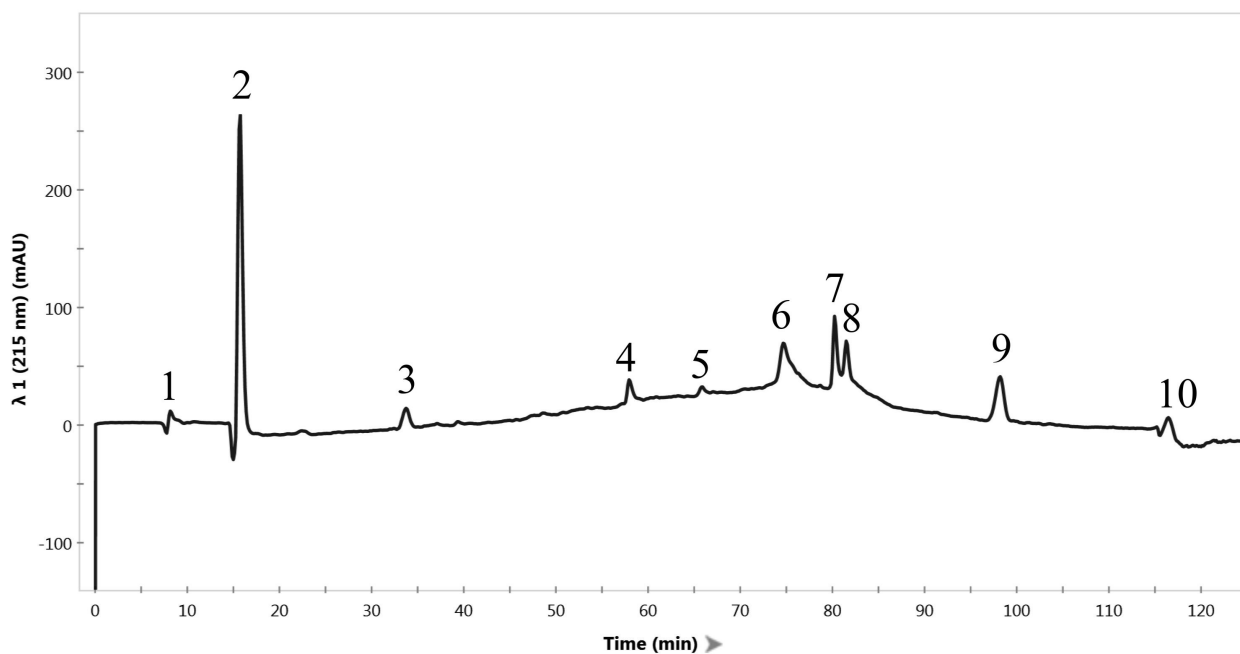


Рисунок 15. Хроматограмма разделения смеси белков и пептидов в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%, изократическое разделение в 100% буфере В

Таблица 3. Параметры пиков на длине волны $\lambda = 215$ нм при разделении смеси в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%, изократический буфер В 100%

№ пика	Время удерживания, мин	Высота пика, mAU	Абсолютная площадь, мл*mAU	Относительная площадь, %
1	8,17	11,93	4,96	2,15
2	15,71	269,77	46,15	20,01
3	33,76	14,36	3,16	1,37
4	56,57	25,60	9,2	7,57
5	65,9	<i>Невозможно определить параметры вследствие искривления базовой линии</i>		
6	74,62			
7	80,25			
8	81,52			
9	98,19	41,17	16,74	7,26
10	116,42	6,43	1,36	0,59

При наложении на рис. 15 профиля элюции по длине волны $\lambda = 280$ нм для детекции ароматических аминокислот (рис. 16) становится ясно: отсутствие поглощения на этой длине волны в предыдущих опытах вызвано неподходящей методикой разделения, потому что из графика чётко видно, что вместе с фракциями, имеющими высокое время удерживания элюируются и молекулы, содержащие ароматические системы, поглощающие на длине волны $\lambda = 280$ нм.

Для исключения возможности влияния длительности разделения на выход молекул с временем удерживания >40 мин было решено изменить параметры элюирования — заменить градиент буфера В от 0 до 100% на градиент буфера В от 0 до 50% и сразу же изократический режим на 100% буфера В. Результаты такого разделения изображены на рис. 17. Очевидно, что группы молекул, которым соответствуют пики №№ 1, 2, 4 и 6 аналогичны группам из предыдущих разделений, однако в градиентном режиме появляется пик № 3, а в изократическом — пики №№ 4 и 5. Пик № 3 имеет

большое значение оптической плотности (таблица 4), поэтому спутать с пиком № 2 с рис. 15 его невозможно.

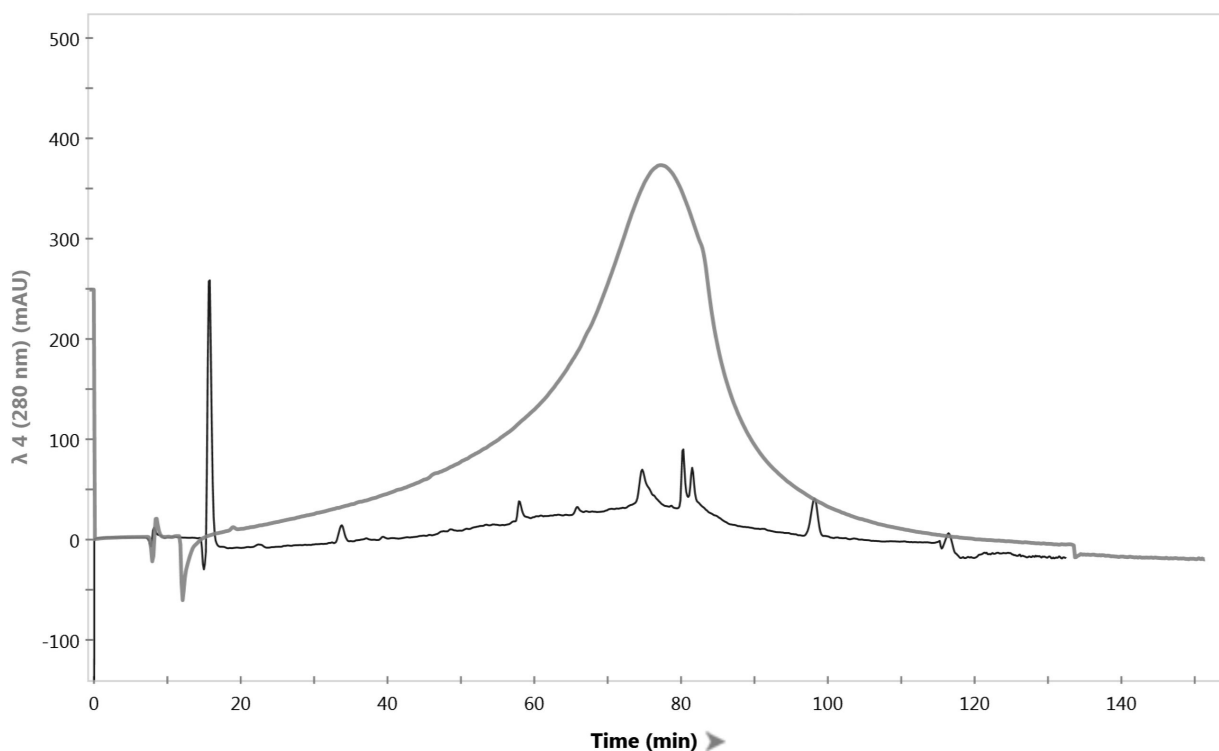


Рисунок 16. Хроматограмма разделения смеси белков и пептидов в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 100%, изократическое разделение в 100% буфере В, измерение на длинах волн $\lambda = 215$ нм (тонкая чёрная линия) и 280 нм (жирная серая линия)

Можно предположить, что изменение условия разделения повлияло на порядок элюции, и некоторая часть молекул, выходящих в изократическом режиме, элюировалась в градиентном. Изменение времени удерживания пиков №№ с 4 по 6, а также профиль элюции на длине волны $\lambda = 280$ нм позволяет сказать, что группы молекул, которым соответствуют пики с 4 по 10 на рис. 15, элюируются только в изократическом режиме буфера В, однако из-за сравнительно быстрого прохода через колонку не достигается значительного разрешения пиков, и они сливаются в один пик № 5. Элюция этих молекул только в изократическом режиме органического растворителя свидетельствует о том, что в их составе содержатся полярные аминокислоты,

растворимость которых в 100% ацетонитриле выше, чем в воде или водной смеси.

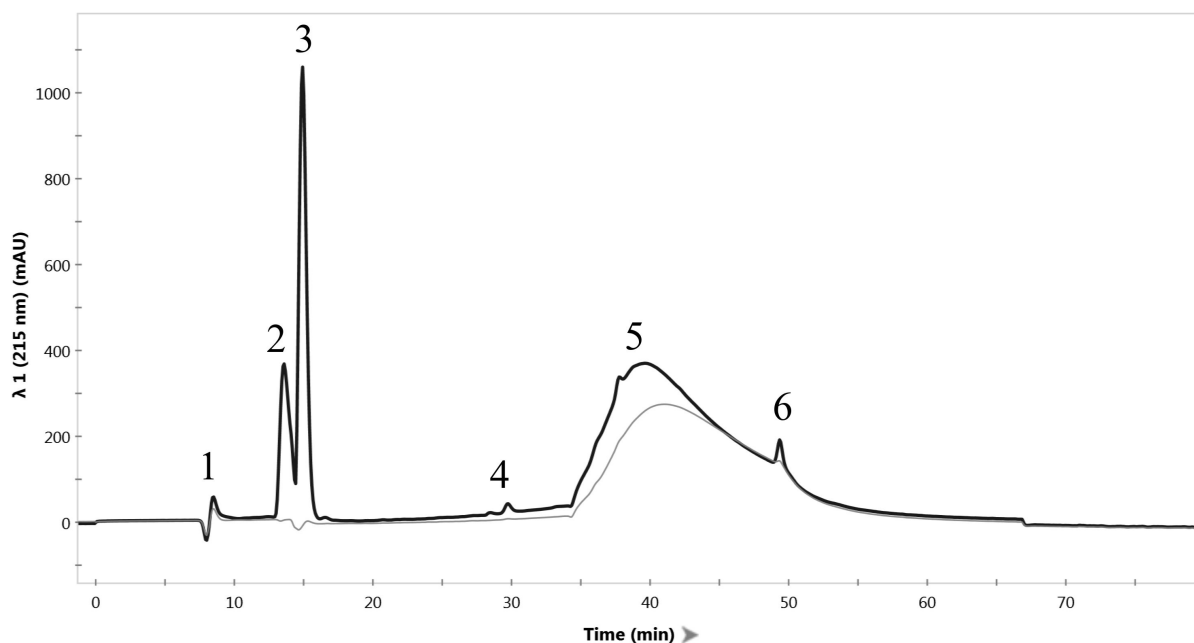


Рисунок 17. Хроматограмма разделения смеси белков и пептидов в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 50%, изократическое разделение в 100% буфере В, измерение на длинах волн $\lambda = 215$ нм (чёрная линия) и 280 нм (серая линия)

Таблица 4 — Параметры пиков на длине волны $\lambda = 215$ нм при разделении смеси в концентрации 400 мкг/мл, градиент буфера В от 0 до 50%, изократический буфер В 100%

№ пика	Время удерживания, мин	Высота пика, mAU	Абсолютная площадь, мл*mAU	Относительная площадь, %
1	8,48	59,5	13,64	0,8
2	13,57	369,66	93,37	5,47
3	14,92	1060,32	208,19	12,2
4	29,73	43,37	13,17	0,77
5	39,61	370,25	1072,94	62,52
6	49,35	14,81	Искавление базовой линии	

Для дополнительного разделения полярной части молекул содержимое пика № 5 было собрано коллектором фракций, освобождено от содержания ацетонитрила и снова пропущено через колонку сразу в изократическом режиме 100% буфера В (рис. 18).

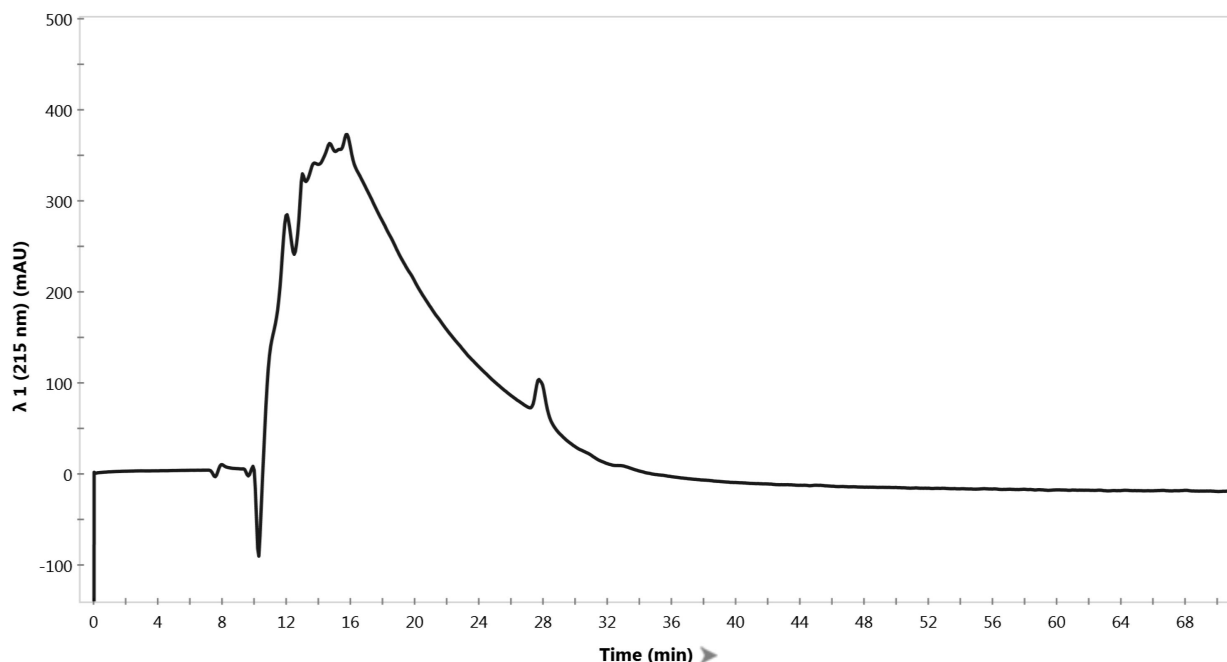


Рисунок 18. Хроматограмма разделения смеси белков и пептидов, собранной коллектором фракций, изократическое разделение в 100% буфере В без градиента

Характер хроматограммы позволяет сказать, что адекватного разделения таким способом не происходит: высокий пик, множество вершин и пологий правый «склон» говорят об элюции разнородной группы молекул, которые так и не смогли разделиться в текущих условиях элюирования, поэтому определять параметры профиля элюции не имеет смысла.

По итогам ВЭЖХ можно сказать, что в мёде содержится целый спектр индивидуальных и различных по структуре и составу белковых молекул пчелиного происхождения, назначение которых неизвестно в силу неидентифицированности каждой из них. Не исключено, что многие из них обладают биологической активностью, в том числе антибактериальными

свойствами.

3.4 Антибактериальное тестирование диско–диффузионным методом

Определение антибактериальной активности очищенного препарата белков и пептидов мёда производилось диско–диффузионным методом, при котором препарат и контрольные субстанции наносились на диски из полиэфирной ткани и помещались на питательную среду, засеянную *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecalis*.

На полиэфирные диски диаметром 6 мм препарат белков и пептидов наносился в концентрациях 50 и 100 мкг/мл в объёме 5 мкл, в итоге на дисках оказалось по 0,25 и 0,5 мкг белков и пептидов (в пересчёте на сухой вес). В качестве ориентира для выбора количества наносимого вещества использовалась статья с изучением антибактериальных свойств гликопротеина MRJP-1, выделенного из мёда [17], где для оценки антибактериальной активности таким же методом наносили препарат в количестве 0,4, 0,2 и 0,1 мкг чистого вещества. Предварительно все инструменты, приборы и диски дезинфицировались 70% водным раствором этилового спирта, а после нанесения диски стерилизовались оксидом этилена. В качестве положительного контроля на антибактериальную активность использовались диски с нанесённой смесью антибиотиков амикоцина и ванкомицина в концентрациях 30 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно. Исследование проводилось в рамках подбора антибактериального покрытия для манжеты клапана сердца. Покрытие в случае наличия антибактериального эффекта должно уменьшать вероятность возникновения инфекционного перикардита после имплантации клапана как по причине послеоперационного осложнения уже имеющегося инфекционного заболевания, так и вследствие заражения больничной антибиотикоустойчивой инфекцией. Результаты исследования представлены

на рисунках с 19 по 22.

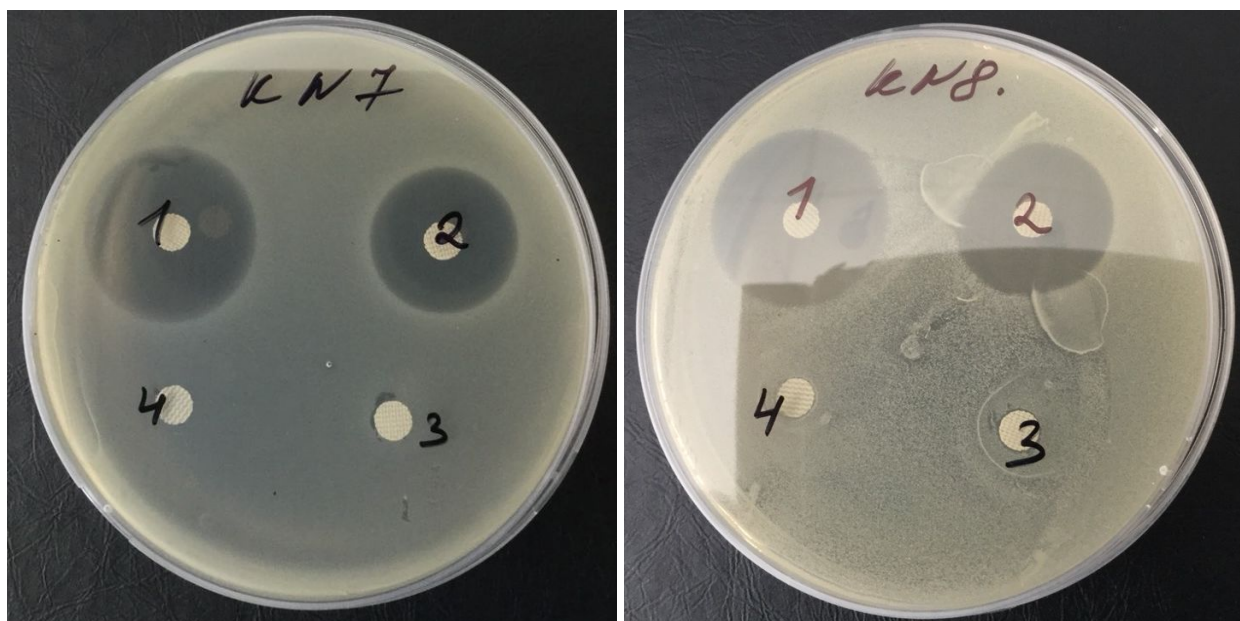


Рисунок 19. Посев культур эпидермальных стафилококков

Staphylococcus epidermidis с дисками контроля и антибактериальными пептидами (диск снизу слева — белки и пептиды в концентрации 50 мкг/мл, справа — 100 мкг/мл, диски сверху — диски контроля)



Рисунок 20. Посев культур золотистых стафилококков

Staphylococcus aureus с дисками контроля и антибактериальными пептидами (диск снизу слева — белки и пептиды в концентрации 50 мкг/мл, справа — 100 мкг/мл, диски сверху — диски контроля)

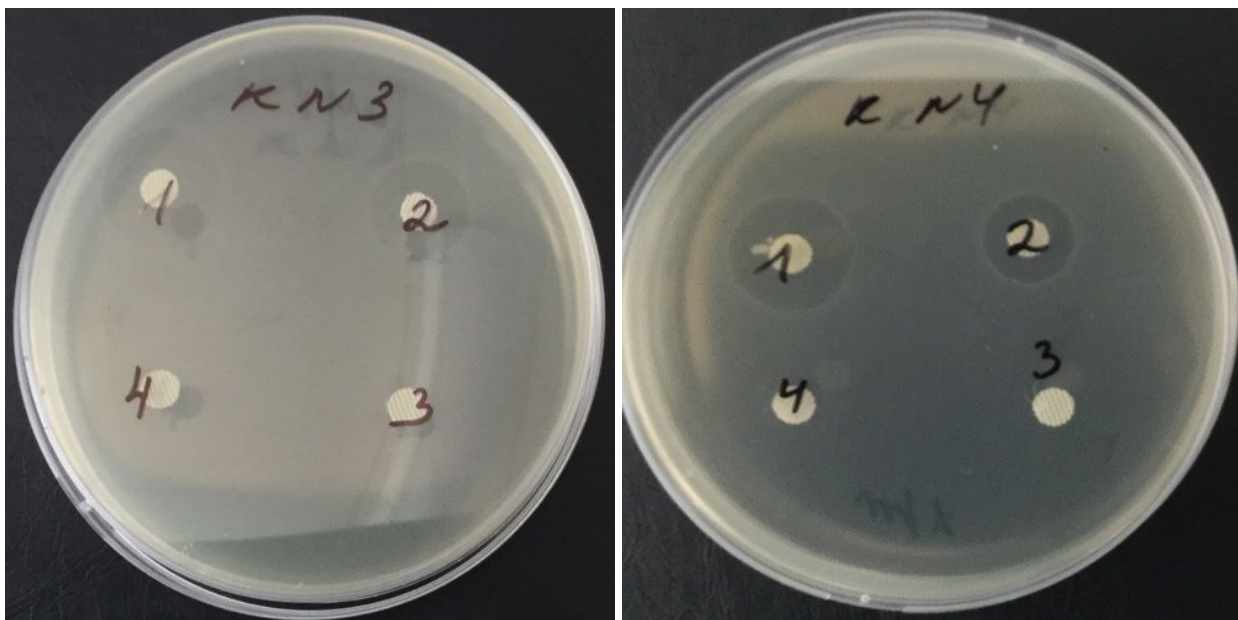


Рисунок 21. Посев культур энтерококков *Enterococcus faecalis* с дисками контроля и антибактериальными пептидами (диск снизу слева — белки и пептиды в концентрации 50 мкг/мл, справа — 100 мкг/мл, диски сверху — диски контроля)



Рисунок 22. Посев культуры синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* с дисками контроля и антибактериальными пептидами (диск снизу слева — белки и пептиды в концентрации 50 мкг/мл, справа — 100 мкг/мл, диски сверху — диски контроля)

В результате тестирования получены данные, что препарат белков и

пептидов в концентрациях 50 и 100 мкг/мл не способен подавлять рост культур *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecalis*, а следовательно, не может использоваться в качестве антибактериального препарата. Объяснить наблюдаемое можно тремя способами:

1. на диски было нанесено малое количество препарата. В упоминаемой статье [17] концентрации наносимых для антибактериального тестирования веществ выбирались из расчёта минимальной ингибирующей концентрации, определённой до этого пробными тестами с различным содержанием гликопротеина. Однако следует учитывать, что на диски наносилось чистое вещество, тогда как в данном случае исследовалась антибактериальная активность смеси, то есть всей совокупности очищенных белков и пептидов мёда. Из этого следует, что молекулы, действительно обладающие антибактериальной активностью, могли попасть на диски в составе смеси в очень малом количестве, недостаточном для заметного ингибирования роста культуры.
2. на диски была нанесена смесь белков и пептидов мёда без содержания антибактериального компонента. Гипотетическое отсутствие в смеси антибактериального компонента может быть вызвано методическим просчётом при очистке белков и пептидов мёда. Для выделения последних использовался метод ионообменной хроматографии, поэтому антибактериальная компонента мёда могла не сорбироваться на ионообменнике и выходить в свободном объёме колонки вместе с углеводами и другими молекулами из состава мёда, а закрепившиеся белки и пептиды могут вовсе не обладать антимикробными свойствами.
3. в процессе очистки антимикробные свойства белков и пептидов могут быть утрачены. Не исключено, что в процессе всех манипуляций с раствором мёда антибактериальные белковые агенты могут подвергаться химической модификации солями буфера или терять свою

нативную конформацию вследствие воздействия тех же солей, других химических веществ или в процессе сушки в суховоздушном термостате. Если учесть, что антибактериальным агентом мёда могут быть пептиды, то второй вариант можно отместить из-за незначительности изменения конформации коротких белковых молекул, однако первый вариант химической модификации всё ещё остаётся актуальным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на результатах моей работы можно сказать, что не смотря на отсутствие в тестируемых образцах препарата белков и пептидов мёда антибактериального эффекта, следует продолжить попытки создания антибактериального препарата на основе пчелиного мёда, потому что множественные литературные данные говорят о том, что мёд обладает антимикробным эффектом, и он с большой долей вероятности может быть опосредован наличием в нём ещё не идентифицированных белковых молекул, обладающих такими свойствами.

По результатам исследований можно сделать следующие выводы:

1. в мёде содержится целый спектр различных белковых молекул, в том числе и пептиды;
2. метод ионообменной хроматографии не является оптимальным для выделения белков и пептидов из мёда;
3. полученный в ходе выполнения ВКР препарат белков и пептидов мёда в концентрациях 50 и 100 мкг/мл в количестве 0,25 и 0,5 мкг соответственно не обладает антимикробным эффектом в отношении культур *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecalis*.

Дальнейшее направление моей научной работы — совершенствование методов и техник выделения и очистки белков и пептидов мёда, поиск антибактериальных белковых агентов мёда и создание антибактериального препарата белковой природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поль Ф. Болезни пчёл, диагностика и лечение. — М.: Издательство Астрель, 2004. — 199 с.
2. Adams, C. J. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey / C. J. Adams, C. H. Boulton, B. J. Deadman, J. M. Farr, M. N. Grainger, M. Manley-Harris, M. J. Snow // *Carbohydr Res.* — 2008. — Vol. 343. — No. 3. — P. 651-659
3. Adams, C. J. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey / C. J. Adams, M. Manley-Harris, P. C. Molan // *Carbohydr Res.* — 2009. — Vol. 344. — No. 8. — P. 1050-1053.
4. Ali, A. T. Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori* / A. T. Ali, M. N. Chowdhury, M. S. al Humayyd // *Tropical gastroenterology.* — 1991. — Vol. 12. — No. 3. — P. 139-142
5. Alonso, M. Rapid identification of linezolid resistance in *Enterococcus* spp. based on high-resolution melting analysis / M. Alonso, M. Marin, C. Iglesias, E. Bouza, D. García de Viedma // *Journal of Microbiological Methods.* — 2014. — Vol. 98. — P. 41-43
6. Andersson, D. I. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides / D. I. Andersson, D. Hughes, J. Z. Kubicek-Sutherland // *Drug Resist Updat.* — 2016. — Vol. 26. — P. 43-57
7. Antimicrobial resistance [Текст]: global report on surveillance // Всемирная организация здоровья. — 2014. — 256 с.
8. Bartlett, J. G. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics / J. G. Bartlett, D. N. Gilbert, B. Spellberg // *Clinical Infectious Diseases.* — 2013. — Vol. 56. — No. 10. — P. 1445-1450.
9. Bastos, P. Human Antimicrobial Peptides in Bodily Fluids: Current Knowledge and Therapeutic Perspectives in the Postantibiotic Era / P.

- Bastos, F. Trindade, J. D Costa, R. Ferreira, R. Vitorino // Medical Research reviews. — 2017. — No. 0. — P. 1-46. Published online
10. Bíliková, K. Apisimin, a new serine–valine–rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization / K. Bíliková, J. Hanes, E. Nordhoff, W. Saenger, J. Klaudiny, J. Simúth // FEBS Lett. — 2002. — Vol. 528. — No. 1-3. — P. 125-129
 11. Blaskovich, M. A. T. The Fight Against Antimicrobial Resistance Is Confounded by a Global Increase in Antibiotic Usage / M. A. T. Blaskovich // ACS Infect. Dis. Published online
 12. Blondelle, S. E. Lipid–induced conformation and lipid–binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity / S. E. Blondelle, K. Lohner, M. — I. Aguilar // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes. — 1999. — Vol. 1462. — Issue 1-2. — P 89-108
 13. Bowdish, D. M. Impact of LL-37 on anti–infective immunity / D. M. Bowdish, D. J. Davidson, Y. E. Lau, K. Lee, M. G. Scott, R. E. Hancock // J Leukoc Biol. — 2005. — Vol. 77. — No. 4. — P. 451-459
 14. Breukink, E. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore–forming peptide antibiotic / E. Breukink, I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. G. Sahl, B. de Kruijff // Science. 1999. — Vol. 286. — Issue 5448. — P. 2361-2364
 15. Brogden K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors on bacteria? / K. A. Brogden // Nature. — 2005. — Vol. 3. — P. 238-250
 16. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences / K. A. Brogden, M. Ackermann, P. B. McCray Jr, B. F. Tack // International journal of antimicrobial agents. — 2003. — Vol. 22. — No. 5. — P. 465-478
 17. 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. — Vol. 10. — No. 4. Published online
18. Bucekova, M. Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation in vitro and in vivo / M. Bucekova, M. Sojka, I. Valachova, S. Martinotti, E. Ranzato, Z. Szep, V. Majtan, J. Klaudiny, J. Majtan // Sci Rep. — 2017. — Vol. 7. — No. 1. Published online
 19. Bucekova, M. Microwave processing of honey negatively affects honey antibacterial activity by inactivation of bee-derived glucose oxidase and defensin-1 / M. Bucekova, V. Juricova, E. Monton, S. Martinotti, E. Ranzato, J. Majtan // Food Chem. — 2018. — No. 240. — P. 1131-1136
 20. Casteels-Josson, K. Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Post-translational Conversion of the Precursor Structures / K. Casteels-Josson, W. Zhang, T. Capaci, P. Casteels, P. Tempst // The journal of biological chemistry. — 1994. — Vol. 269. — No. 46. — P. 28569-28575
 21. Casteels, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst // The EMBO Journal. — 1989. — Vol. 8. — No. 8. — P. 2387-2391
 22. Casteels, P. Functional and Chemical Characterization of Hymenoptaecin, an Antibacterial Polypeptide That Is Infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*) / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, P. Tempst // The journal of biological chemist. — 1993. — Vol. 268. — No. 10. — P. 7044-7054
 23. Castle, M. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets / M. Castle, A. Nazarian, S. S. Yi, P. Tempst // J Biol Chem. — 1999. — No. 74. — P. 32555-32564
 24. Challacombe, C. A. Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat / C. A. Challacombe, M. A. — A. el Sayed, K. Seetharaman // Journal of Cereal Science. — 2012. — Vol. 56. — No. 2. — P. 181-188
 25. Cheng, J. T. The importance of bacterial membrane composition in the

- structure and function of aurein 2.2 and selected variants / J. T. Cheng, J. D. Hale, M. Elliot, R. E. Hancock, S. K. Straus // *Biochim Biophys Acta*. — 2011. — Vol. 1808. — No. 3. — P. 622-633
- 26.da Silva, P. M. Honey: Chemical composition, stability and authenticity / P. M. da Silva, C. Gauche, L. V. Gonzaga, A. C. Costa, R. Fett // *Food Chem*. — 2016. — Vol. 196. — P. 309-323
- 27.Dhople, V. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions / V. Dhople, A. Krukemeyer, A. Ramamoorthy // *Biochim Biophys Acta*. — 2006. — Vol. 1758. — Issue 9. — P. 1499-1512
- 28.Evans, J. D. Immune pathways and defence mechanisms in honeybee *Apis Mellifera* / J. D. Evans, K. Aronstein, Y. P. Chen, C. Hetru, J. — L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G. J. Thompson, Z. Zou, D. Hultmark // *Insect Molecular Biology* — 2006. — Vol. 15. — No. 5. — P. 645-656
- 29.Falla, T. J. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin / T. J. Falla, D. N. Karunaratne, R. E. Hancock // *J Biol Chem*. — 1996. — Issue 271. — P. 19298-19303
- 30.Fujiwara, S. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin / S. Fujiwara, J. Imai, M. Fujiwara, T. Yaeshima, T. Kawashima, K. Kobayashi // *J Biol Chem*. — 1990. — Vol. 265. — No. 19. — 11333-11337
- 31.Ganz, T. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils / T. Ganz, M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton // *J Clin Invest*. — 1985. — Vol. 76. — No. 4. — P. 1427-1435
- 32.García, J. R. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction / J. R. García, F. Jaumann, S. Schulz, A. Krause, J. Rodríguez-Jiménez, U. Forssmann, K. Adermann, E. Klüver, C. Vogelmeier, D. Becker, R. Hedrich, W. G. Forssmann, R. Bals // *Cell Tissue Res*. —

2001. — Vol. 302. — Issue 2. — P. 257-264
33. Gross, M. Antibiotics in crisis / M. Gross // *Current Biology*. — 2013. — Vol. 23. — Issue 24. — P. 1063-1065.
 34. Gu, B. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus* / B. Gu, T. Kelesidis, S. Tsiodras, J. Hidler, R. M. Humphries // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 2013. — Vol. 68. — Issue 1. — P. 4–11
 35. Guaní-Guerra E. Antimicrobial peptides: immunomodulatory properties, functions and therapeutic applications in humans / E. Guaní-Guerra, M. L. Terán // *Antimicrobial Peptides* / edited M. D. Seong, Y. I. Hak — NY: Nova Science Publishers, 2013. — 168 p.
 36. Hilchie, A. L. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides / A. L. Hilchie, K. Wuerth, R. E. Hancock // *Nat Chem Biol*. — 2013. — Vol. 9. — No. 12. — P. 761-768
 37. Hoyle, B. D. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms / B. D. Hoyle, J. W. Costerton // *Prog Drug Res*. — 1991. — Issue 37. — P. 91-105.
 38. Hultmark, D. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia* / D. Hultmark, H. Steiner, T. Rasmuson, H. G. Boman // *Eur. J. Biochem*. — 1980. — No. 106. — P. 7-16
 39. Jenssen, H. Peptide Antimicrobial Agents / H. Jenssen, P. Hamill, R. E. Hancock // *Clin Microbiol Rev*. — 2006. — Vol. 19. — No. 3. — 491-511
 40. Junaid, A. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments / A. Junaid, Q. A. Rafiq, A. Ratcliff // *Future Sci OA*. — 2018. — Issue 4. Published online
 41. Kamarajan, P. Nisin ZP, a Bacteriocin and Food Preservative, Inhibits Head and Neck Cancer Tumorigenesis and Prolongs Survival / P. Kamarajan, T. Hayami, B. Matte, Y. Liu, T. Danciu, A. Ramamoorthy, F. Worden, S. Kapila, Y. Kapila // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10. — No. 7. Published

online

42. Klein, E. Y., (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 / E. Y. Klein, T. P. Van Boeckel, E. M. Martinez, S. Pant, S. Gandra, S. A. Levin, H. Goossens, R. Laxminarayan // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Published online
43. Kumar, P. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo / P. Kumar, J. N. Kizhakkedathu, S. K. Straus // *Biomolecules*. — 2018. — Vol 8. — Issue 1. — P. 4
44. Kwakman, P. H. Antibacterial components of honey / P. H. Kwakman, S. A. Zaat // *IUBMB Life*. — 2012. — Vol. 64. — No. 1. — P. 48-55
45. Kwakman, P. H. How honey kills bacteria / P. H. Kwakman, A. A. te Velde, L. de Boer, D. Speijer, C. M. Vandenbroucke–Grauls, S. A. Zaat // *FASEB J.* — 2010. — Vol. 24. — No. 7. — P. 2576-2582
46. Lee, T. H. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure / T. H. Lee, K. N. Hall, M. I. Aguilar // *Curr Top Med Chem*. — 2016. — Vol. 16. — No. 1. — P. 25-39
47. Lehrer, R. I. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes / R. I. Lehrer, K. Daher, T. Ganz, M. E. Selstd // *Infect. Immun.* — 1985. — Vol. 54. — No. 2. — P. 467-472
48. Levy, S. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses / S. Levy, B. M Marshall // *Nature Medicine*. — 2004. — Vol. 10. — No. 12. — P. 122-129.
49. Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity / Y. J. Liu // *Cell*. — 2001. — Vol. 106. — No. 3. — P. 259-262
50. Luyt, C. — E. Antibiotic stewardship in the intensive care unit / C. — E. Luyt, N. Bréchet, J. — L. Trouillet, J. Chastre // *Critical Care*. — 2014. — Vol. 18. — Issue 5. — P. 480-492.

51. Malanovic, N. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria / N. Malanovic, K. Lohner // *Pharmaceuticals* (Basel). — 2016. — Vol. 9. — Issue 3. — P. 59
52. Mattick, A. T. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci / A. T. Mattick, A. Hirsch // *Lancet*. — 1947. — Vol. 250. — No. 6462. — P. 5-8
53. Niyonsaba, F. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis / F. Niyonsaba, K. Iwabuchi, A. Someya, M. Hirata, H. Matsuda, H. Ogawa, I. Nagaoka // *Immunology*. — 2002. — Vol. 106. — No. 1. — P. 20-26
54. Otvos Jr., L. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides / L. Otvos Jr, I. O, M. E. Rogers, P. J. Consolvo, B. A. Condie, S. Lovas // *Biochem*. — 2000. — No. 39. — P. 14150-14159
55. Park, C. B. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions / C. B. Park, H. S. Kim, S. C. Kim // *Biochem Biophys Res Commun*. — 1998. — Vol. 244. — Issue 1. — P. 253-257
56. Petretto, G. L. Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys / G. L. Petretto, M. Cossu, M. C. Alamanni // *International Journal of Food Science and Technology*. — 2014. — Vol. 50. — Issue 2. — P. 482-491
57. Piddock, L. J. V. The crisis of no new antibiotics — what is the way forward? / L. J. V. Piddock // *The Lancet infectious diseases*. — 2012. — Vol. 12. — No. 3. — P. 249-253.
58. Rapaport, D. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers / D. Rapaport, Y. Shai // *J Biol Chem*. — 1991. — Vol. 266. — No. 35. — P. 23769-23775
59. Read, A. F. Antibiotic resistance management / A. F. Read, R. J. Woods // *Evolution, medicine, and public health*. — 2014. — Vol. 2014. — No. 1. — P. 147.

60. Reti, R. Thymosin beta4 is cytoprotective in human gingival fibroblasts / R. Reti, E. Kwon, P. Qiu, M. Wheeler, G. Sonse // *European journal of oral sciences*. — 2008. — Vol. 116. — No. 5. — P. 424-430
61. Rozek, A. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles / A. Rozek, C. L. Friedrich, R. E. Hancock // *Biochemistry*. — 2000. — Vol. 39. — Issue 51. — 15765-15774
62. Rozek, T. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* / T. Rozek, K. L. Wegener, J. H. Bowie, I. N. Oliver, J. A. Carver, J. C. Wallace, M. J. Tyler // *European Journal of Biochemistry*. — 2003. — Vol 267. — Issue 17. — P. 5330-5341.
63. Salzman, N. H. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin / N. H. Salzman, D. Ghosh, K. M. Huttner, Y. Paterson, C. L. Bevins // *Nature*. — 2003. Published online
64. Selsted, M. E. Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans* / M. E. Selsted, D. Szklarek, T. Ganz, R. I. Lehrer // *Infect. Immun.* — 1985. — Vol. 49. — No. 1. — P. 202-206
65. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides / Y. Shai // *Biopolymers*. — 2002. — Vol. 66. — Issue 4. — P. 236-248
66. Simlai, A. Partial purification and characterization of an antimicrobial activity from the wood extract of mangrove plant *Ceriops decandra* / A. Simlai, K. Mukherjee, A. Mandal, K. Bhattacharya, A. Samanta, A. Roy // *EXCLI Journal*. — 2016. — No. 15. — P. 103-112
67. Simone-Finstrom, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees / M. Simone-Finstrom, M. Spivak // *Apidologie*. — 2010. — Vol. 41. — No. 3. — P. 295-311
68. Sitaram, N. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity // N. Sitaram N,

- R. Nagaraj // *Biochim Biophys Acta*. — 1999. — Vol. 1462. — Issue 1-2. — P. 29-54
69. Starks, P. T. Fever in honeybee colonies / P. T. Starks, C. A. Blackie, D. Thomas, P. T. Seeley // *Naturwissenschaften*. — 2000. — No. 87. — P. 229–231
70. Steffen, H. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge / H. Steffen, S. Rieg, I. Wiedemann, H. Kalbacher, M. Deeg, H. — G. Sahl, A. Peschel, F. Götz, C. Garbe, B. Schitteck // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. — 2006. — Vol. 50. — No. 8. — P. 2608-2620
71. Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats / C. L. Ventola // *Pharmacy and Therapeutics*. — 2015. — Vol. 40. — No. 4. — P. 277-283.
72. Viswanathan, V. K. Off-label abuse of antibiotics by bacteria / V. K. Viswanathan // *Gut Microbes*. — 2014. — Vol. 5. — Issue 1. — P. 3-4.
73. Vuong, C. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system / C. Vuong, J. M. Voyich, E. R. Fischer, K. R. Braughton, A. R. Whitney, F. R. DeLeo, M. Otto // *Cellular microbiology*. — 2004. — Vol. 6. — Issue 3. — P. 269-275
74. Walsh, C. T. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective / C. T. Walsh, T. A. Wencewicz // *The Journal of antibiotics*. — 2014. — Vol. 67. — No. 1. — P. 7.
75. Watanabe, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria / T. Watanabe // *Bacteriological Reviews*. — 1963. — Vol. 27. — No. 1. — P. 87.
76. Wilson, C. L. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense / C. L. Wilson, A. J. Quillet, D. P. Satchell, T. Ayabe, Y. S. López-Boado, J. L. Stratman,

- S. J. Hultgren, L. M. Matrisian, W. C. Parks // Science. — 1999. — Vol. 286. — Issue 5437. — P. 113-117
77. Wimley, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model / W. C. Wimley // ACS Chem Biol. — 2010. — Vol. 5. — No. 10. — P. 905-917
78. Zairi, A. Dermaseptins and magainins: antimicrobial peptides from frogs' skin—new sources for a promising spermicides microbicides—a mini review / A. Zairi, F. Tangy, K. Bouassida, K. Hani // J Biomed Biotechnol. — 2009. — Vol. 2009. Published online
79. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // Nature — 2002. — No. 415. — P. 389-395.
80. Zhang, L. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis / L. Zhang, J. Parente, S. M. Harris, D. E. Woods, R. E. Hancock, T. J. Falla // Antimicrob Agents Chemother. — 2005. — Vol. 49. — No. 7. — 2921-2927
81. Zhang, L. Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm—Specific Resistance to Antibiotics / L. Zhang, T-F. Mah // Journal of Bacteriology. — 2008. — Vol. 190. — Issue 13. — P. 4447-4452

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»

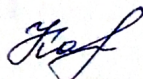
Направление подготовки

06.04.01 Биология

Магистерская программа «Биохимия и
молекулярная биология»

Утверждаю

Зав. кафедрой

 Г. А. Карпова
«25» сентября 2017 г.

Задание

По ВКР студента Клыченкова Сергея Викторовича

Тема работы: «Изучение антибактериальных свойств пептидов меда»

Утверждена приказом по Университету от «29» декабря 2017 г. № 1381/0

Срок сдачи студентом законченной работы «17» мая 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	Сентябрь 2017	<i>Выполнено</i>
2.	Поиск научной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	Сентябрь-декабрь 2017	<i>Выполнено</i>
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	Декабрь 2017	<i>Выполнено</i>
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР: • Ультрафильтрация. • Ионообменная хроматография. • Реакция Селиванова. • Обессоливание гель-фильтрацией. • ВЭЖХ. • Высушивание. • Измерение концентрации белка спектрофотометрически на длине волны 280 нм. • Диско-диффузионный метод определения антибактериальной активности	Январь 2018	<i>Выполнено</i>
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	Январь-февраль 2018	<i>Выполнено</i>
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	Январь-февраль 2018	<i>Выполнено</i>
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	Январь 2018	<i>Выполнено</i>
8.	Разделение и концентрирование молекул мёда с помощью ультрафильтрации	Январь-февраль 2018	<i>Выполнено</i>
9.	Очистка концентрированного раствора мёда от углеводов и разделение белковых молекул методом ионообменной хроматографии	Февраль-март 2018	<i>Выполнено</i>
10.	Подготовка водного раствора белков и пептидов мёда, выделенных с помощью ионообменной хроматографии, обессоливание их смеси гель-фильтрацией, выпаривание раствора	Март-апрель 2018	<i>Выполнено</i>
11.	Анализ водного раствора белков и	Май 2018	<i>Выполнено</i>

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	Сентябрь 2017	Внешено
2.	Поиск научной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	Сентябрь-декабрь 2017	Внешено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	Декабрь 2017	Внешено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР: • Ультрафильтрация. • Ионообменная хроматография. • Реакция Селиванова. • Обессоливание гель-фильтрацией. • ВЭЖХ. • Высушивание. • Измерение концентрации белка спектрофотометрически на длине волны 280 нм. • Диско-диффузионный метод определения антибактериальной активности	Январь 2018	Внешено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	Январь-февраль 2018	Внешено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	Январь-февраль 2018	Внешено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	Январь 2018	Внешено
8.	Разделение и концентрирование молекул мёда с помощью ультрафильтрации	Январь-февраль 2018	Внешено
9.	Очистка концентрированного раствора мёда от углеводов и разделение белковых молекул методом ионообменной хроматографии	Февраль-март 2018	Внешено
10.	Подготовка водного раствора белков и пептидов мёда, выделенных с помощью ионообменной хроматографии, обессоливание их смеси гель-фильтрацией, выпаривание раствора	Март-апрель 2018	Внешено
11.	Анализ водного раствора белков и	Май 2018	Внешено