

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

«ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ИЗ МЁДА»

Студент  Угарова Юлия Андреевна

Руководитель  Соловьев В. Б.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 20.06.17 № 15)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Иммунодефицитные состояния и иммуностимулирующие препараты.....	7
1.1.1 Иммунодефициты второго типа, их классификация, причины возникновения, показания к проведению иммуностимулирующей терапии....	7
1.1.2 История изучения иммуностимуляторов, их классификация, самые распространенные препараты.....	9
1.1.3 Современные иммуностимулирующие препараты пептидной природы, применяемые в медицине.....	10
1.2 Регуляция иммунной системы посредством антимикробных пептидов....	12
1.2.1 Механизмы действия антимикробных пептидов.....	12
1.2.2 Катионные и анионные антимикробные пептиды.....	14
1.2.3 Иммуномодулирующая способность антимикробных пептидов.....	15
1.3 Антимикробные пептиды пчелиного происхождения.....	17
1.3.1 Механизмы социального и индивидуального иммунитета пчел <i>Apis Mellifera</i>	17
1.3.2 Апидаецин, как основной антибактериальный пептид пчел.....	18
1.3.3 Абаецин- сходства и отличия от апидаецинов.....	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Метод ультрафильтрации.....	22
2.1.1 Принцип метода.....	22
2.1.2 Схема работы ультрафильтрационной установки Vivaflow.....	24
2.1.2 Подготовка мембраны к работе.....	24
2.2 Метод ионообменной хроматографии.....	25
2.2.1 Принцип метода ионообменной хроматографии.....	25
2.2.2 Компоненты хроматографической системы и часто применяемые материалы матриц.....	27
2.2.3 Подготовка ионообменника к работе.....	29

2.2.4 Заполнение колонки, нанесение образца, условия хроматографирования.....	31
2.3 Метод Лоури.....	32
2.4 Реакция Селиванова.....	34
2.5 Лиофилизация.....	35
2.6 Тестирование препарата на иммуностропность.....	36
2.6.1 Приготовление препарата.....	36
2.6.2 Метод исследования.....	37
2.7 Создание модели иммунодефицита.....	37
2.7.1 Влияние пептидов меда на показатели гуморального иммунитета.....	38
2.7.2 Влияние пептидов меда на интерфероногенез.....	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	40
3.1 Предварительная обработка меда для начала исследования.....	40
3.2 Ультрафильтрация на установке VivaFlow.....	42
3.3 Хроматографическое разделение.....	42
3.3.1 Анионная хроматография.....	43
3.3.2 Катионообменная хроматография.....	44
3.4 Тест на иммуностропность.....	45
3.4.1 Влияние пептидного препарата на показатели клеточного иммунитета мышей.....	49
3.4.2 Влияние пептидов меда на показатели гуморального иммунитета.....	50
3.4.3 Влияние пептидов меда на интерфероногенез.....	51
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	55

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Человеческий организм постоянно подвергается вирусным и инфекционным атакам, защитить от которых призвана иммунная система, представляющая собой сложную многоуровневую структуру, обладающую эффектом памяти, способностью к обучению и состоящую из клеток, тканей и органов. Даже небольшое нарушение функционирования одного из компонентов иммунной системы, вызванное стрессом, несбалансированным питанием, неблагоприятной экологической обстановкой, малоподвижным образом жизни, подверженностью вредным привычкам (т.к. курение и употребление алкоголя), может привести к ее общему ослаблению, что является причиной развития различных заболеваний, перетекающих в хронические, если их не удалось своевременно выявить и устранить. Поэтому, залогом здоровья человека является не симптоматическое и антипатогенное лечение, т.е. устранение симптомов и причины заболевания, а забота об укреплении иммунной системы ресурсами и средствами, достаточными для обеспечения ее самостоятельной борьбы с возбудителями болезней, среди которых протекающие бессимптомно. Поддержание адекватного уровня работы иммунной системы поможет избежать осложнений, вызванных влиянием заболевания на другие системы организма или продолжительным применением лекарственных препаратов, в большинстве своем имеющих токсический эффект, а так же исключит влияние на социальную жизнь человека, выраженное в потере трудоспособности или распространении эпидемии и пандемии. Для регуляции деятельности иммунной системы используют природные или синтетические иммуномодулирующие лекарства.

Согласно литературным источникам [6], молочко, которым пчелы прикармливают личинку, как и питательная смесь из перги и меда, употребляемая личинками с третьего дня развития, богато белком, сахаром, жирами, содержит минеральные соли, витамины и ферменты, поэтому можно

предположить, что закладка, а в дальнейшем и регуляция иммунной системы пчелы начинается именно в этот период. Большое количество белкового компонента в питании личинки обеспечивает ее стремительный рост, набор массы и правильное формирование органов, что в дальнейшем определяет работоспособность пчелы.

Наличие у меда бактерицидных свойств заметили еще во времена Древнего Египта, где медовыми бальзамами смазывали тела умерших, чтобы предотвратить процессы разложения [22]. Современные исследования показали, что благодаря высокому содержанию сахаров (около 80%), низкому значению pH из-за содержания нескольких органических кислот, мед препятствует размножению не только бактерий, к числу которых относятся и болезнетворные, но и плесневых грибов [6]. Не последнюю роль в формировании бактерицидных свойств сыграла сама пчела, через слюну которой в мед, маточное и пчелиное молочко поступает огромное число ферментов и пептидов, в том числе антимикробных. Разведенный в несколько раз мед, несмотря на уменьшенную концентрацию содержащихся в нем сахаров и изменение его кислотности, сохраняет бактерицидную активность за счет антимикробных пептидов [24]. Природные антимикробные пептиды (ПАП) представляют собой небольшие многофункциональные катионные молекулы, которые проявляют бактерицидную активность в отношении широкого спектра бактерий, грибов и вирусов. ПАП обеспечивают врожденный иммунный ответ не только как антимикробные агенты, но и как иммуностимулирующие молекулы, связывающие врожденный и адаптивный иммунный ответ [37].

Высокая антимикробная активность в сочетании с низкой токсичностью для клеток макроорганизма, а также многообразие видов биологической активности, позволяют рассматривать ОПП как перспективную основу для создания новых антибиотических и иммуномодулирующих лекарственных препаратов для коррекции различных видов патологии, а детальное изучение биологических свойств различных

представителей этого структурного класса пептидов является важным направлением исследований экспериментальной медицины.

Целью данной работы является изучение физико-химических свойств иммуностимулирующего фактора меда.

Достигнуть поставленной цели помогло решение следующих **задач**:

1. Провести анализ литературных источников, связанных с темой иммуностимуляторов, пчелиных и антимикробных пептидов, методами их выделения, очистки и испытания физиологической активности.

2. Выделить и очистить пептиды мёда, тем самым подготовив их к дальнейшим испытаниям.

3. Оценить иммуностимулирующий эффект выделенных пептидов

Бакалаврская работа написана на 56 листах, содержит 15 рисунков, 8 таблиц и список литературы на русском и английском языке из 48 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Иммунодефицитные состояния и иммуностимулирующие препараты

1.1.1 Иммунодефициты второго типа, их классификация, причины возникновения, показания к проведению иммуностимулирующей терапии

Иммунодефицитные состояния (ИДС), требующие приема иммуностимулирующих лекарственных препаратов в зависимости от причины могут быть:

- первичный/первого типа, вызванные наследственными факторами, включающих в себя дефицит антител или иммунокомпетентных клеток;
- вторичный/второго типа, вызванными нарушением работы изначально здоровой иммунной системы.

На сегодняшний день, лечение иммунодефицита первого типа направлено на устранение проявления болезни путем введения больших доз антибиотиков, витаминов, иммуноглобулинов и т.д. , а не на устранении генетического дефекта, ответственного за развитие заболевания. ИДС второго типа при правильной диагностике причины нарушения функционирования иммунной системы поддаются лечению с большей вероятностью благоприятного исхода.

Для лечения и диагностики ИДС второго типа делят на две подгруппы, основываясь на причинах и следствиях развития патологии [17]:

1. Иммунологическая недостаточность постоянного типа

- *собственно "вторичный иммунодефицит"*, возникающий в постнатальном периоде после перенесенных заболеваний или воздействий,

результатом которых является поражение иммунных клеток (ВИЧ-инфекция, лимфопролиферативные заболевания). При таких заболеваниях иммуностимулирующие препараты не применяют.

- *нарушение взаимосвязей между компонентами иммунной системы* обнаружить затруднительно, т.к при обследовании дефект конкретного компонента у пациента либо не выявляется вовсе, либо выявляется не стабильно. Данное иммунное нарушение могут спровоцировать физиологические состояние, такие как беременность, старчество и детский возраст, а также несбалансированное питание, эндогенные и экзогенные интоксикации, инвазии различной причины, инфекции. Такие заболевания, при отсутствии противопоказаний, лечатся с помощью иммуностимулирующих препаратов.

2. Транзисторная иммунологическая недостаточность

- *неадекватность терапии основного заболевания*, вызванная неэффективным лечением лекарственными препаратами (например, антибиотиками) или же неудачным оперативным вмешательством, в результате которого очаг воспаления при инфекции не был устранен. В таких случаях применение иммуномодуляторов может привести к развитию аллергических реакций, ведь на активно работающую из-за перенесенного заболевания, благодаря которому было проведено медикаментозное или хирургическое вмешательство) иммунную систему дополнительное стимулирование будет действовать угнетающе.

- *эндогенная интоксикация вследствие основного заболевания*, является следствием накопления продуктов катаболизма и регуляторных пептидов, блокирующих рецепторы клеток [18], [20]. Однако, ИДС данный случай не относится и устраняется посредством проведения мероприятий по детоксикации [15].

- *переход острого процесса в хронический* останавливает своевременное применение иммуностимулирующих препаратов, усиливающих ответ организма на патологический процесс.

Из классификации можно сделать вывод, что не всегда применение иммуностимулирующих препаратов будет оправданно, в некоторых случаях их назначение может привести к неадекватному функционированию иммунной системы.

1.1.2 История изучения иммуностимуляторов, их классификация, самые распространенные препараты.

Стремительное распространение опухолевых заболеваний в медицинской практике привело к тому, что в 1851 году иммуностимулирующие препараты нашли широкое применение и стали объектом изучения иммунологов. Однако, уже в 20-30 годах XX столетия, иммуномодуляторы были вытеснены химиотерапией, как более эффективным способом лечения онкологии, и интерес к ним поугас. В последние 15-20 лет, интерес к иммуноактивным препаратам возрос за счет расширения возможностей оценки иммунного статуса человека и более глубокого понимания иммунопатогенеза первичных и вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных, аллергических и опухолевых заболеваний, а также получения новых поколений иммуноактивных препаратов разного происхождения [23].

Согласно Российскому Федеральному руководству по использованию лекарственных средств, все иммуномодулирующие средства делятся на три группы [21]:

I. Препараты экзогенного происхождения

- Бактериальные
- Растительные

II. Препараты эндогенного происхождения

1. Иммунорегуляторные пептиды

- естественные
- химически синтезированные

2. Цитокины

- интерлейкины
- интерфероны (природные, рекомбинантные)
- индукторы интерферона (природные, синтетические)
- прочие препараты

III. Химически чистые и синтезированные препараты

- Вещества, полученные с помощью направленного синтеза
- Аналоги иммуномодуляторов эндогенного происхождения

К самым распространенным препаратам [9], применяемым во врачебной практике, относят так называемые "вакциноподобные" средства-лизаты бактерий (имудон, ИРС-19, рибомунил, бронхо-мунал), микробные макромолекулярные соединения (мурамилдипептид, продигиозан, пирогенал, нуклеинат натрия), средства растительного происхождения (эхинацея пурпурная — смесь 80 мл свежего сока и 22% по объёму этилового спирта) и синтетические иммуномодуляторы (пидотимод, полиоксидоний). Не стоит забывать, что иммуностимулирующая терапия не панацея от всех болезней, прибегать к ней необходимо лишь в том случае, когда врач, проведя необходимые обследования и анализы, констатирует клиническое проявление иммунной недостаточности. Иммуностимуляторы выступают в роли вспомогательного средства и не применяются без препарата, воздействующего на причину развития заболевания. Кроме того, доказательство эффективности иммуномодуляторов основано на единичных рандомизированных клинических испытаниях и мнениях экспертов, что является недостаточным.

1.1.3 Современные иммуностимулирующие препараты пептидной природы, применяемые в медицине

К центральным органам иммунитета, как известно, причисляют костный мозг и тимус, регулирующие соответственно развитие гуморального и клеточного иммунного ответа. Пептиды тимуса обладают иммуностимулирующим действием, которое проявляется в адекватном изменении функционального состояния Т-клеток иммунитета. После нарушений в функциях иммунной системы организма применение полипептидов тимуса отличается способностью к восстановлению функциональной активности и баланса субпопуляций Т-лимфоцитов, то есть уменьшенные показатели увеличиваются, а гиперактивные процессы среди отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов восстанавливаются до близких к нормальному уровню значений [10].

Тактивин является препаратом 1-го поколения (к которым также относятся Тимоптин, Тималин, Вилозен, Тимостимулин и др.) — группа экстрагированных из тимуса крупного рогатого скота пептидов. Наличие в Тактивине тимического гормона $\alpha 1$ - тимозина выделяет препарат среди остальных. Особенной популярностью пептидные экстракты из тимуса (Тимуровак, Тимомодулин, Тимостимулин) пользуются в ряде стран Западной Европы. Следует заметить, что тимусовые препараты представляют собой смесь биологически активных пептидов, стандартизация которых проходит довольно тяжело. Препараты в третьем и втором поколений являются синтетическими аналогами натуральных гормонов тимуса, таких как $\alpha 1$ - тимозин и тимопоэтин, или же биологически активными фрагментами этих гормонов. Так, препарат Тимоген — состоящий из триптофана и глутамин дипептид, входящий в состав препарата Тималина и проявляющий выраженную иммуностимулирующую активность [5]. Аминокислотный состав препарата Бестим отличается от Тимогена только наличием γ -пептидной связи и присутствием D-, а не L-глутамин.

Активность Бестима в тесте стимуляции дифференцировки костномозговых предшественников лимфоцитов благодаря таким изменениям повысилась. Иммунофан, препарат третьего поколения, ни что иное, как синтетический гексапептид — аналог участка 32–36 тимопоэтина [4]. Миелопид относится к препаратам костномозгового происхождения. Это полученный экстракцией из культуры клеток костного мозга млекопитающих препарат пептидной природы. Препарат представляет собой комплекс 6 пептидных биорегуляторных медиаторов (миелопептидов), которые вырабатываются свинными клетками костного мозга, и их молекулярная масса находится в диапазоне от 500 до 2000 D, Применение Миелопида стимулирует продукцию антител, восстанавливает показатели гуморального звена иммунитета, а также функциональную активность иммунокомпетентных клеток) [2].

1.2 Регуляция иммунной системы посредством антимикробных пептидов

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой группу относительно коротких (менее 100 аминокислот) положительно заряженных пептидов, продуцируемых самыми разными организмами в рамках их первой линии защиты. Эти пептиды обладают широким спектром противомикробной активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, простейших и вирусов. Несмотря на их весьма разнообразную структурную организацию, большинство из них проявляет тенденцию к принятию амфифильной конформации в мембранных средах. Этот признак коррелировал с их способностью разрушать бактериальные мембраны, что в конечном итоге приводит к лизису клеток [48]. Помимо этого разрушающего мембрану механизма, некоторые АМП проявляют бактерицидное действие, который полностью лишен какой-либо видимой дестабилизации мембраны [40].

1.2.1 Механизмы действия антимикробных пептидов

Антимикробные пептиды представляют собой обильную и разнообразную группу молекул, которые продуцируются многими тканями и типами клеток во множестве видов беспозвоночных, растений и животных. Их аминокислотный состав, амфипатия, катионный заряд и размер позволяют им прикрепляться и вставляться в мембранные бислои для образования пор с помощью «бочкообразного», «коврового» или «тороидально-пористого» механизмов. «Модель бочки» получила свое название благодаря структуре, образующейся из гидрофильных участков пептидов, встраивающихся между ацильными «хвостами» фосфолипидов так, чтобы гидрофобные участки оказывались снаружи, образуя пору, напоминающую бочку без дна и крышки. Согласно «ковровой» модели, пептиды с положительно заряженными частицами одинаковым слоем покрывают мембрану патогена, которая в нескольких местах начинает разрушаться, создавая электростатический эффект, затрудняющий развитие устойчивости микроорганизма, т.к. для этого необходима коррекция структуры и электрофизиологических свойств мембраны. Благодаря этому, у резистентных штаммов снижается конкурентоспособность.

В «тороидальной» модели стенки пор образуют не только пептиды, но и из содержащихся в мембране патогенного организма липидных частиц, что обуславливает пору тороидную форму. Большое количество пор, образованных в мембране, приводит к потере устойчивости и гибели бактерии, т.к. цитоплазма прорывает перфорированную мембрану и выходит вместе с органеллами во внешнюю среду.

Хотя эти модели полезны для определения механизмов антимикробной пептидной активности, их актуальность в отношении того, как пептиды повреждают и убивают микроорганизмы, все еще нуждается в уточнении. В последнее время высказывались предположения о том, что образование

трансмембранных пор не является единственным механизмом микробного убийства. Фактически, несколько наблюдений показывают, что транслоцированные пептиды могут изменять образование цитоплазматической мембраны, ингибировать синтез клеточной стенки, ингибировать нуклеинокислотный синтез, ингибировать синтез белка или ингибировать ферментативную активность [25].

1.2.2 Катионные и анионные антимикробные пептиды

Противомикробные пептиды представляют собой уникальную и разнообразную группу молекул, которые делятся на подгруппы на основе их аминокислотного состава и структуры [45].

Одна подгруппа содержит анионные антимикробные пептиды. Среди них небольшие пептиды (721.6–823.8 Da), присутствующие в экстрактах сурфактанта, бронхоальвеолярной лаважной жидкости и эпителиальных клетках дыхательных путей. Они вырабатываются в мили мольных концентрациях, требуют наличия цинка в качестве кофактора для антимикробной активности и активны против грамположительны и грамотрицательных бактерий. Анионные АМП аналогичны про-пептидам, нейтрализующим заряд больших размеров, которые также обладают антимикробной активностью, когда их синтезируют отдельно [31]. Отрицательный заряд пептиду обеспечивает глутаминовая и аспарагиновая аминокислота.

Вторая подгруппа содержит ~ 290 катионных пептидов, которые имеют в структуре меньше 40 аминокислотных остатков, не содержат остатки цистистеина. В водных растворах многие из этих пептидов разупорядочены, но в присутствии трифторэтанола, мицелл додецилсульфата натрия (SDS), фосфолипид-везикулы и липосомы или липид А, все или часть их молекул превращается в α -спираль [34].

Механизм действия АМП на бактериальную мембрану базируется на электростатическом эффекте, т.е. воздействие происходит на липидный слой мембраны бактерий, имеющий отрицательный заряд, в то время как сами пептиды заряжены положительно (катионные АМП). Большинство мембранно-активных АМП являются амфипатическими, что означает, что они имеют как катионные, так и гидрофобные поверхности. Эта особенность обеспечивает начальное электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженной клеточной мембраной и вставкой во внутреннюю оболочку мембраны. Действия антибактериальных пептидов не прекращаются после этого начального взаимодействия. Гидрофобная часть пептида помогает вставить молекулу АМП в клеточную мембрану [39].

Анионные АМП(аАМП) из-за своего заряда не могут напрямую взаимодействовать с мембраной бактерий, поэтому в этом им предположительно помогает образование комплекса с ионами цинка. Также возможно, что аАМП проникают внутрь патогенной клетки через образованные катионными АМП поры и подавляют жизнедеятельность бактериальной клетки, связываясь с индивидуальными или общими сайтами взаимодействия [41].

Однако, в вопросе механизма действия катионных и анионных АМП многое пока остается без ответа. Например, почему иногда пептиды оказывают бактериологическое действие на патогены одного типа, а другие, с тем же зарядом мембраны, игнорируют. Нет объяснений и тому, каким образом происходит взаимодействие с электрически нейтральным липидным слоем клеточных мембран млекопитающих.

1.2.3 Иммуномодулирующая способность антимикробных пептидов

Два основных класса традиционных иммуностимулирующих пептида человека - это дефензины и кателицидины. Классические молекулы

дефензина включают группу малых амфифильных, иногда с высоким содержанием аргинина, катионных пептидов, которые, как правило, состоят из 29-45 аминокислотных остатков. Дефензины идентифицированы в клетках других типов, в том числе в тканевых макрофагах, мелких клетках кишечного эпителия и кардиомицетах. В коже человека дефензины продуцируются в основном кератиноцитами, нейтрофилами, потовыми и сальными железами и могут выделяться как в обычных условиях, так в ответ на воспалительный стимул.

hCAP-18, обладающий α -спиральным строением, известный также как LL-37, является единственным изученным антимикробным пептидом из семейства кателицидинов, и впервые был описан в 1995. Кателицидины обнаруживаются в разных количествах во множестве видов, в том числе у млекопитающих. Общим признаком кателицидиновых пептидов является хорошо заметное сходство, определяемое как кателиновый домен в 50 зонах и антимикробный домен С-конца, который, при необходимости, может меняться и высвобождается путем протеолиза. Кателицидины, как правило, экспрессируются миелоидными клетками-предшественниками, но также известно, что у некоторых видов они экспрессируются в зрелых циркулирующих нейтрофилах и лимфоидной ткани новорожденных. Они накапливаются в виде неактивных пропептидов и процессируют только в ответ на стимуляцию, высвобождая в межклеточную жидкость активные иммуностимулирующие пептиды. Вырабатываются они преимущественно лейкоцитами и клетками эпителия и слизистой оболочки, где они накапливаются в специфических гранулах [30]. Предполагается, что антимикробные и цитотоксические функциональные свойства зрелых дефензинов и других иммуностимулирующих пептидов в основном ассоциируются с наличием у них, как у мультимеров, способности образовывать поры в мембранах, ведущие к самопроизвольной диффузии.

Противомикробные свойства ИЗП как мембранных агентов, обладающих вторичной α -спиральной пептидной структурой, зависит от

наличия ионной среды, сходной с физиологическими жидкостями млекопитающих. Иммуностимулирующие пептиды нацелено определяют самое слабое место микробной цитоплазматической мембраны (например, отсутствие холестерина и негативно заряженные фосфолипиды на внешнем листе цитоплазматической мембраны).

1.3 Антимикробные пептиды пчелиного происхождения

1.3.1 Механизмы социального и индивидуального иммунитета пчел *Apis Mellifera*

Численность пчелиной семьи огромна, в период медосбора может достигать 50 тысяч особей [46], а значит, так же велик риск развития инфекционных заболеваний, угрожающих данной популяции, т.к. тепло, влажность в улье и обилие питательных веществ приводит к стремительному развитию патогенных микроорганизмов. Благодаря коллективному взаимодействию, пчелы предотвращают распространение заболевания, тем самым спасаясь от гибели. К разновидности социального иммунитета пчел относят инстинкт чистки, заключающийся в истреблении зараженных личинок или изгнании из семьи взрослых особей из улья, чтобы остановить распространение инфекции. Выработка прополиса, который благодаря своему составу, обладает противомикробным действием, что позволяет пчелам использовать его для дезинфекции сот, ремонта брешей в улье, предотвращающий проникновение извне патогенных бактерий [44], тоже относится к механизму социального иммунитета, как и деление семьи, высокий оборот пчел и чувствительность личинок к заболеваниям [7]. По сравнению с другими Двукрылыми, у пчел наблюдается снижение количества генов групп, отвечающих за иммунитет [32]. Это говорит о том, что ввиду высокой социализации, роль индивидуального иммунитета пчелы уходит на второй план, но это не делает пчелу бессильной в одиночку

преодолеть поражающую ее инфекцию. Как представителю отряда Двукрылых, пчелам свойственны ряд средств, способствующих адекватному функционированию иммунной системы. Их клеточный иммунитет включает в себя гемоциты (клетки крови), обладающие способностью к передвижению (по амебоидному типу), поглощению и перевариванию отмерших клеток, чужеродных компонентов или патогенных организмов, что приводит к торможению развития заболевания. Это одна из немногих параллелей с врожденным иммунитетом позвоночных, к которым так же относится секреция антимикробных пептидов, меланизация и ферментативная деградация патогенов. Так же, пчелы защищены слоем противомикробных выделений, покрывающих тельце, и агрессивной средой кишечника, не дающей инфекции проникнуть в организм с пищей или во время манипуляций, связанных с ротовым аппаратом [36]. Помимо вышеперечисленного, пчела вырабатывает две группы антимикробных пептидов- апидаецины и абаецины.

1.3.2 Апидаецин, как основной антибактериальный пептид пчел

Хотя насекомые испытывают недостаток в основных компонентах иммунной системы позвоночных, таких как лимфоциты и иммуноглобулины, они разработали альтернативные защитные механизмы против инфекций. Различные типы пептидных факторов, проявляющих бактерицидную активность, были обнаружены у некоторых видов насекомых, в том числе у медоносных пчел. Апидаецины представляют собой новое семейство индуцированных, пролиносодержащих (33%) пептидных антибиотиков со следующей базовой структурой: GNNRP (V / I) YIPQPRPPHPR (L / I). Структурно апидаецин состоит из двух областей: консервативной (постоянной) области, отвечающей за общую антибактериальную способность, и варибельной области, отвечающей за спектр антибактериальных препаратов. Это термостабильные пептиды,

сохраняющие свои свойства при значении $pH = 2$. В лимфе взрослой медоносной пчелы обнаруживаются только активные формы апидаецина, а личинки пчел содержат значительные количества неактивных молекул его предшественников. Обладая высокой активностью против широкого спектра патогенов растений и человека, он оказывает на грамотрицательные бактерии не литическое действие, а бактериостатическое [28]. Пролинсодержащие АМП могут перемещаться по клеточной мембране патогенного организма, проникать в цитоплазму и направлять основные клеточные процессы, чтобы опосредовать гибель клеток.

Механизм действия апидаецина [38], при котором погибают бактерии, включает в себя начальное неспецифическое связывание пептидов с компонентом внешней стороны мембраны патогенного организма. Это связывание сопровождается вторжением в периплазматическое пространство клетки и специфической, необратимой комбинацией с рецепторной молекулой, которая может быть компонентом транспортной системы пермиазного типа на внутренней стороне мембраны. На заключительной стадии пептид транслоцируется во внутреннюю часть клетки, где он достигает своей конечной мишени- шаперонов, контролирующих процесс фолдинга некоторых белков [41]. Доказательство того, что апидецины синтезированные химическим путем проявляют ту же бактерицидную активность, что и его природные аналоги, а также того, что они нетоксичны для клеток человека и животных, является предпосылкой для их использования в качестве нового поколения антибиотиков.

1.3.3 Абаецин- сходства и отличия от апидаецинов

Абаецин состоит из 34 аминокислотных и 10 пролиновых остатков, его структура, лишенная спирального вида, выглядит следующим образом: YVPLPNVPQPGRRPFPTFGQPGNPKIKWPQGY. Спектр действия этого антимикробного пептида не широк: он не способен в отличие от апидаецина,

ингибировать рост бактерий при средней ионной силе, а удельная активность против грамотрицательных бактерий ниже, чем у остальных АМП. Более того, его наивысшая наблюдаемая удельная активность была направлена против штамма *Xanthomonas*, устойчивого к апидаецину [29]. Абаецин проявляет максимум антибактериальной способности при малой ионной силе, а максимальное его содержание в лимфе пчелы регистрируется лишь спустя двое суток от заражения.

Недавно было обнаружено, что высокие концентрации абаецина не оказывают никакого действия на грамотрицательные бактерии, такие как *Escherichia coli* [42]. Однако, его более низкие концентрации в присутствии порообразующего пептида гименоптецина (АМП, который коэкспрессируется *in vivo* с абаецином) для *E. coli* были летальны [27]. Обратного потенцирования между этими АМП добились путем создания мембранных пор, которые давали доступ абаецину к его внутриклеточной мишени и абацину. Уменьшили минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) компонентов путем ингибирования белкового обмена и препятствовали восстановлению пор бактерий [43].

Предположительно, предшественником абаецина и апидаецина может быть диптерицин- антимикробный пептид, который обнаружен только в личиночных формах насекомого *Phormia regina*. Доказательством этому может являться схожий аминокислотный состав и высокая масса диптерицина [31]. Литическое происхождение исключается за счет различий в скорости действия абаецина и остальных двух АМП, а также за счет разных требований к условиям внешней среде, антимикробной активности и времени синтеза.

* * *

Применение пептидов меда в качестве иммуностимулирующего препарата, как наиболее эффективного способа лечения заболеваний и предотвращение развития осложнений, имеет большое количество

обоснований. Во-первых, это минимальное количество противопоказаний к применению за счет естественного происхождения пептидов, а также широкий спектр действия, распространяющийся как на грамположительные, грамотрицательные бактерии, а также на грибковые микроорганизмы и некоторые вирусные патогены. Во-вторых, помимо антимикробных пептидов, мед богат другими белковыми и пептидными веществами, повышающими питательную ценность этого продукта, и предохраняющих от порчи. Малоизученность механизмов действия АМП дает широкий простор для дальнейших исследований с целью создания нового антимикробного препарата.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исследуемого образца 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: 100 г мёда растворял в 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 10%-й раствор для концентрирования и селективного удаления молекул с массой выше 10 кДа фильтровал на ультрафильтрационной установке MasterFlex с мембраной Vivaflow. Полученный концентрированный фильтрат хранился в плотно закрытой стеклянной таре в морозильной камере и использовался для дальнейшего анализа.

2.1 Метод ультрафильтрации

2.1.1 Принцип метода

Для реализации данного метода использовалась установка Vivaflow, разделяющая жидкость на два потока, благодаря полупроницаемой мембране. Разделяемые компоненты, которые меньше по размеру, чем поры мембраны, проходят через нее из-за разницы в создаваемом давлении, образуя пермеат, а оставшиеся крупные компоненты, составляют ретентату. Параллельно мембране движется сильный поток, который не дает во время фильтрации засориться ее поверхности, потому что поток с частицами проходит по касательной к поверхности мембраны, не пересекая ее насквозь. Данная технология, которую называют фильтрацией в *тангенциальном потоке*, позволяет осуществлять процесс фильтрации непрерывно, с

постоянными производственными характеристиками и без блокировки фильтра.

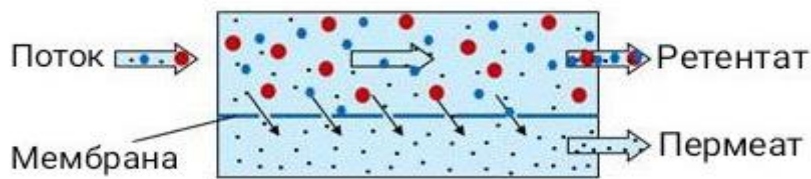


Рис. 1. Схема тангенциального потока жидкости в установках ультрафильтрации

Применение принципа тангенциального потока жидкости позволяет многократно использовать мембраны для ультра- и нанофильтрации, проводя разделение веществ параллельно с очисткой мембраны. Это возможно благодаря тому, что создаваемый перистальтическим насосом ток жидкости омывает поверхность мембраны со стороны предмембранного пространства и заодно очищает её от не прошедших по размеру в поры молекул. Кроме того, метод тангенциального потока подходит для концентрирования фильтруемых растворов. Данный эффект достигается за счёт малого, но постоянного оттока растворителя, уносящего не отфильтрованные молекулы с поверхности мембраны. Из-за сравнительно большой концентрации не прошедших мембрану частиц, молекулы растворителя стремятся связаться за счёт сил межмолекулярного взаимодействия преимущественно с ними, а не с молекулами исходного раствора, которые, с другой стороны, за счёт сил осмоса и разницы давления проникают через мембрану в постмембранное пространство. Т. о. достигается отток молекул растворителя вместе с отходами, потеря целевых частиц с массой, меньшей 10 кДа, минимальна. В итоге, метод ультрафильтрации является эффективным методом разделения белков и пептидов по их молекулярным массам, а также концентрирования исходных растворов.

2.1.2 Схема работы ультрафильтрационной установки Vivaflow

Исходный раствор, который необходимо подвергнуть фильтрации, поступает из резервуара 1 под действием определенного давления, создаваемого перистальтическим насосом 2 в мембрану 3/4. Разделение частиц раствора происходит под давлением; пептиды и остальные молекулы с молекулярной массой меньше 10 кДа мембрана свободно пропускает через себя, затем, молекулы и пептиды попадают в постмембранное пространство 4 и возвращаются снова в резервуар, а оставшиеся в предмембранном пространстве 3 частицы и некоторое количество растворителя вымываются током жидкости в резервуар с отходами 5.

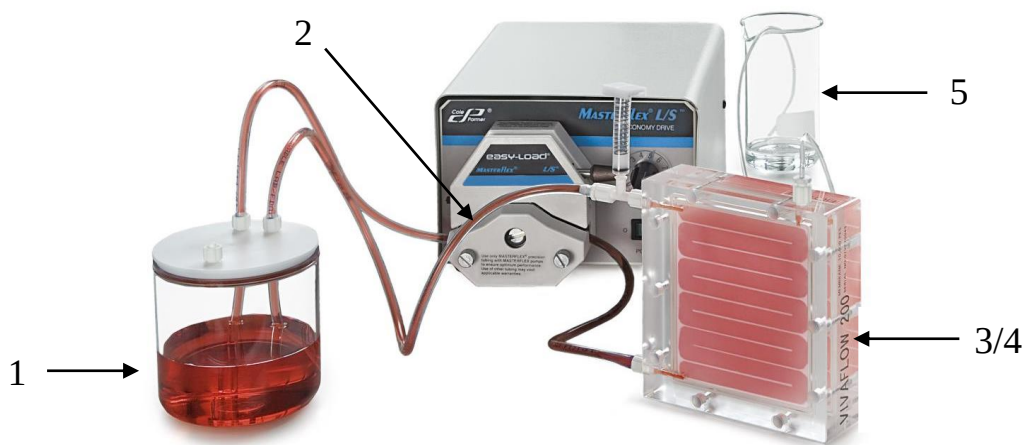


Рис. 2. Рисунок ультрафильтрационной установки Vivaflow (цифрами обозначены: 1 —резервуар для фильтруемой жидкости, 2 — перистальтический насос, 3/4 — мембрана с определённой селективностью, 5 — резервуар для отходов).

2.1.2 Подготовка мембраны к работе

Прежде, чем приступить к фильтрации 10%-го раствора мёда, необходимо подготовить установку ультрафильтрации Vivaflow к работе, очистив мембрану от различных включений, оставшихся после предыдущих

манипуляций с аппаратом. Для этого, емкость с мембраной на три четверти заливают дистиллированной водой и включают перистальтический насос, чтобы создать поток, в котором молекулы воды, проходя через мембрану, а также вдоль ее поверхности, смывают все загрязнения. Когда объем воды в резервуаре уменьшится до одной пятой, для омыления трудноотмываемых частиц промывающий раствор заменяют на 0,5 н NaOH, доливая его до исходного объема, и повторяем действия, произведенные ранее с водой. после того, как процедура завершится, мембрану и все относящиеся к ней трубки необходимо промыть дистиллированной водой, чтобы смыть остатки щелочи и других посторонних примесей, после этого установку можно начинать использовать по назначению.

В емкость для исходного раствора наливают 10%-й раствор мёда, закрывают все клапаны на крышке и запускают перистальтический насос. Необходимо тщательно следить, чтобы давление в мембране было не слишком низким во избежание увеличения времени фильтрации, но и не превышало 3 Бар, что могло бы повредить мембрану и снизить эффективность очистки. После того, как исходный раствор уменьшился приблизительно до 50-70 мл, фильтрацию следует прекратить, а мембрану промыть уже описанным выше способом.

2.2 Метод ионообменной хроматографии

2.2.1 Принцип метода ионообменной хроматографии

Ионообменная хроматография- это колоночный метод разделения веществ. В основу метода положен обратимый стехиометрический обмен содержащимися в растворе ионами, т. е. в жидкой подвижной фазе, на ионы неподвижной фазы —жидких или твердых веществ. Неподвижной фазой в ионообменной хроматографии называют большое количество привязанных к поверхности гранул ионогенных групп, нитей или пор ионообменника.

Элюент является подвижной фазой, он практически постоянно на водной основе; среди его особенностей выделяют природу и концентрацию растворённых солей, рН. Благодаря способности к термодинамическому равновесию, между фазами происходит обмен молекулами разделяемых веществ, осуществляемый направленными диффузионными потоками из одной фазы в другую и протекающий на фоне случайных перемещений молекул в каждой из фаз. Это перемещение в неподвижной фазе носит только тепловой характер, а в подвижной оно связано еще с гидродинамическими условиями течения раствора [3].

Уравнение для ионообменной хроматографии выглядит следующим образом: $I-A + B \rightleftharpoons I-B + A$, где А и В — ионы с зарядами одного знака.

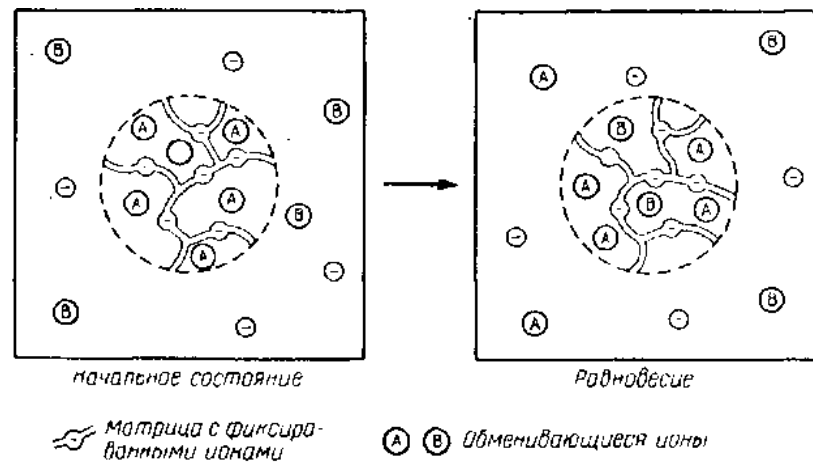


Рис.3. Схематическое изображение обмена ионами между ионитом и раствором.

Направление процесса обмена ионами определяется не сродством ионов к ионообменнику, а концентрацией ионов. В качестве сорбентов при работе с белками чаще всего используют иониты, обладающие высокой степенью гидрофильности, но при этом, белки разделяют и на катионитах, и на анионитах. Выбор типа ионита определяется устойчивостью белка в определённом диапазоне рН и изоэлектрическими точками хроматографируемого материала. Для эффективной сорбции белка необходимы значения рН, отличающихся от их изоэлектрической точки не менее чем на 1. Соответственно, десорбции разделяемых белков от гранул

ионита способствует изменению pH элюента. Хроматографию на анионитах проводят в буферных системах, в которых катион (трис, имидазол, пиридин) является диссоциируемым компонентом, а буферные растворы с анионами (фосфатный, бикарбонатный, ацетатный) выбирают для катионитов. При достаточных размерах колонки пористые сорбенты могут проявлять эффект гель-фильтрации.

2.2.2 Компоненты хроматографической системы и часто применяемые материалы матриц

В качестве ионитов или ионообменников чаще всего используют ионообменные смолы – полимерные синтетические вещества. В их состав входят содержащих подвижные ионы активные группы и матрицы. В зависимости от знака обмениваемых ионов различают аниониты и катиониты. Положительные ионы из растворов поглощают катиониты, а аниониты взамен выделяют в раствор эквивалентное количество отрицательных ионов.

Кислотные группы катионитов обладают различной силой, например сульфо-группы, оксифенильные, карбоксильные. В воде они диссоциируют на подвижные катионы (Kt) и малоподвижный полимерный макроанион (An), например: $R - An^- / H^+$ или $R - An^- / Kt^+$.

В составе анионитов имеются основные группы, например ароматические аминогруппы различной степени замещенности (вплоть до четвертичных) или алифатические. Иониты могут находиться как в ОН-форме и Н-форме, так и в солевой форме. Катиониты в Н-форме и аниониты в ОН-форме содержат соответственно ионы водорода и гидроксила способные к обмену, ионы водорода в солевых формах заменены катионами металла, анионами кислот – анионы гидроксила. Иониты делят на несколько видов в зависимости от силы основных и кислотных групп: слабокислотные ($R-COOH$) и сильнокислотные ($R-SO_3H$) катиониты; слабоосновные ($R-$

NH_3OH) и сильноосновные ($\text{R-N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$) аниониты. Сильноосновные и сильнокислотные иониты к ионному обмену способны и в широком диапазоне pH.

Сильнокислотные катиониты способны обменивать свои подвижные катионы на другие в кислой, щелочной и нейтральной средах.

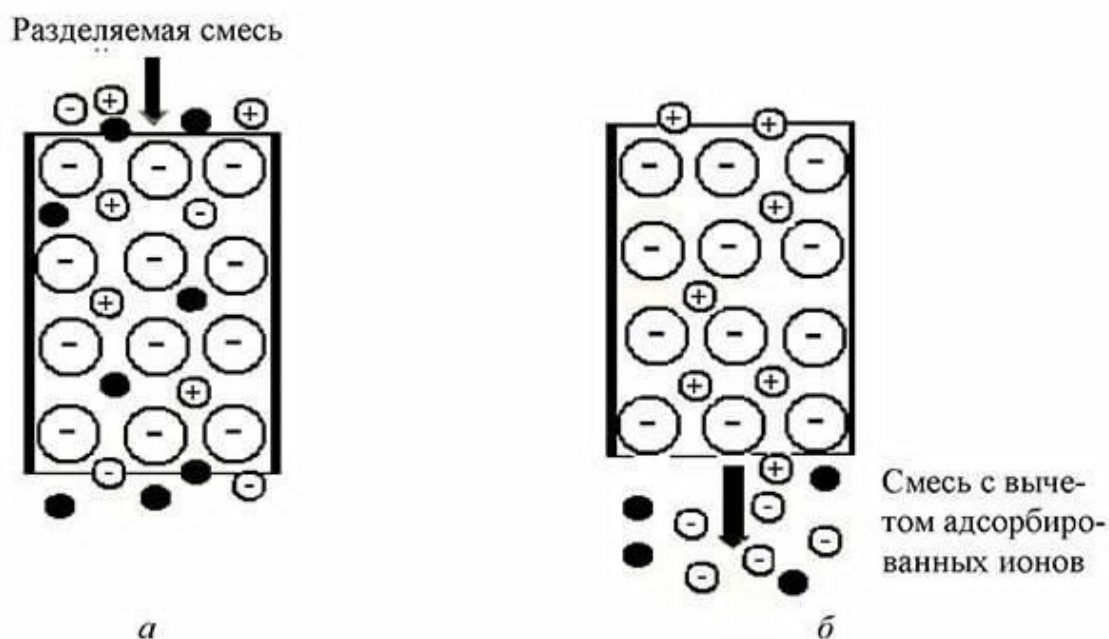
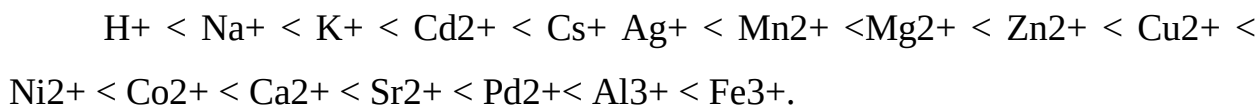


Рис. 4 . Катионообменная хроматография (схематизировано: изображено поверхностное электростатическое взаимодействие с частицами): а, б - две стадии процесса.

Сильнокислотными катионитами называют иониты с сильно диссоциированными функциональными группами –фосфорно-, сульфокислыми. Сульфогруппа смолы связывает различные катионы в зависимости от ионного заряда и размера. Наиболее сильное связывание наблюдается у катионов высшей валентности и большего размера..

К слабокислотным относят иониты, содержащие слабо диссоциированные кислотные остатки – карбоксильные, оксифенильные и некоторые другие. Только в щелочной среде слабокислотные катиониты обменивают ионы водорода. В случае разбавленных растворов наиболее

распространенные катионы можно расположить в следующей последовательности:



Слабоосновные аниониты в составе своей полимерной матрицы содержат третичные, вторичные и первичные аминогруппы, а сильноосновные аниониты содержат функциональные группы четвертичных ониевых оснований (фосфониевых, пиридиниевых, аммониевых) и солей.

В нейтральной, щелочной и кислой средах обменивают подвижные анионы сильноосновные аниониты, а только в кислой среде – слабоосновные. Благодаря неподеленной паре электронов, которая имеется у атомов азота, слабоосновные аниониты могут образовывать комплексы с солями тяжелых, драгоценных и цветных металлов, что делает возможным использование их в качестве селективных сорбентов. Это перспективная область применения слабоосновных анионитов, в отличие от их использования в классических процессах ионообмена, где они проигрывают сильноосновным анионитам.

Для ионогенных групп чаще всего в качестве носителя применяются полиакрилат, агароза, целлюлоза, полистирол, модификации целлюлозы и различные ионообменные смолы. Ионообменники по структуре могут быть набухающими и твердыми минералами, гранулами, жидкими ионитами, пелликулярные иониты (нанесенный на твердое инертное ядро гранулы тонкий слой ионообменника). Носитель выбирается в зависимости от типа элюента, от вида разделяемых веществ и других параметров.

2.2.3 Подготовка ионообменника к работе

Матрицей для анионной хроматографии выступала DEAE-целлюлоза, которая популярна в использовании для хроматографии олигонуклеотидов и белков — это относительно мягкий и крупнопористый обменник. DEAE-целлюлоза представляет собой сухой мелкозернистый порошок белого цвета,

поэтому прежде, чем приступить к работе с ним, необходимо провести его предварительную подготовку.

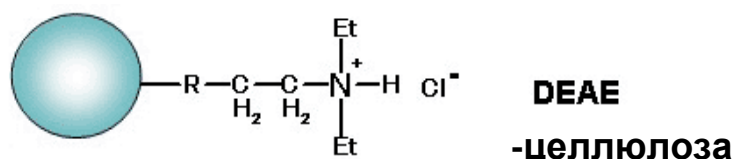


Рис. 5. . Структурная формула DEAE- целлюлозы

Необходимой процедурой подготовки сухих ионообменников на основе целлюлозы является преформирование (precycling). В следствии хранения в сухом виде, между нитями и гранулами целлюлозы образуются дополнительные водородные связи, мешающие эффективной развёртке ионогенных групп, что приводит к затруднению сорбции разделяемых веществ. Поэтому, большим количеством дистиллированной воды заливают навеску массой 3 г и оставляют для набухания на сутки. Из-за небольшой степени набухания DEAE- целлюлозы, заметного увеличения объёма не произойдет. После 24 ч. набухания необходимо взмутить ионообменник и дать гранулам целлюлозы осесть. Осторожно сливая верхний слой воды, необходимо удалить не осевшие обломки гранул, частицы и прочий мусор. Затем, осадок опять залить водой, взмутить и декантировать верхний слой жидкости. Повторяют данную процедуру не меньше трёх раз, до тех пор, пока поверхность не будет свободна от видимых загрязнений. Далее, максимально удаляют верхний слой жидкости, стараясь не взмутить DEAE-целлюлозу и заливают ее 0,5 М раствором HCl, оставляя для полной ионизации ионогенных групп в растворе на 45-60 мин. После этого, либо путём нескольких циклов взмучивания- декантации и добавления воды, либо на фильтре, осторожно промывается вся масса ионообменника, пока раствор не достигнет pH ~ 4. Внимательно следите за тем, чтобы значения водородного показателя не поднялись до нейтральных, иначе в ионогенных группах ионы Cl —будут постепенно заменяться на ионы OH — , что приводит к увеличению времени промывки из-за обратного закисления

раствора. Следующим действием на 45-60 минут замачиваем DEAE-целлюлозу в 0,5 М растворе NaOH, чтобы заменить ионы Cl — на исходные OH — . Затем, промываем ионообменник до нейтральных значений pH, не боясь закисления или защелачивания промываемой воды.

В случае катионитов, например, КМ – целлюлозы, сорбент повторной обработкой кислотой переводят в H⁺ форму. Для этого его суспендируют в 50 – кратном избытке 0,5 раствора HCl в течение 30-60 мин. После фильтрования сорбент отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока pH промывной жидкости не достигнет pH воды.

Для освобождения от мелких и крупных частиц ионит суспендируют в цилиндре на 1л, перемешивают, отстаивают 20-30 мин и верхний слой жидкости с неосевшими мелкими частицами декантируют. Эту операцию повторяют несколько раз (5-6), пока жидкость над осадком будет свободной от мелкой взвеси. Чтобы освободиться от крупных частиц, ионит суспендируют в воде, перемешивают и через минуту суспензию сливают в другой цилиндр.

После описанной обработки ионит уравнивают буферным раствором, в котором осуществляют сорбцию белков на ионообменнике (исходный буферный раствор). Эту процедуру можно проводить как на колонке, так и вне её. Обработку исходным буферным раствором осуществляют до тех пор, пока не произойдёт выравнивание pH элюата на выходе из колонки (или жидкости, в которой суспендируют ионит) с pH исходного буферного раствора. Уравнивание – процесс медленный. Для его ускорения ионит можно сначала обработать раствором того же состава, что и исходный, но с большей концентрацией, а после достижения нужного pH, уравнивание продолжают исходным раствором.

2.2.4 Заполнение колонки, нанесение образца, условия хроматографирования

Для эффективного разделения в аналитических целях достаточно всего 5-7 мл ионообменника, поэтому не стоит выбирать слишком широкую и длинную колонку, как того требует гель-фильтрация. Колонка, используемая в данном опыте, была диаметром 1,75 см, вмещала носитель в объеме 5 мл и выполнена из стекла. Для предотвращения вытекания сорбента, на дно колонки укладывался предварительно смоченный каплей дистиллированной воды кружок фильтровальной бумаги с диаметром, равным колоночному. Далее заливалась взмученная DEAE-целлюлоза или подготовленная КМ-целлюлоза, если речь идет о катионной хроматографии. Перед заливкой новой порции сорбента, предыдущий слой осторожно взмучивают, чтобы исключить перепады плотности ионообменника. Когда необходимый для работы объем сорбента достигнут, в последний раз взмучивается тобл осевших частиц, а когда он уляжется, на поверхность сорбента аккуратно наносят кружок сухой фильтровальной бумаги, чтобы исключить влияние на точность измерения колебания уровня осевших частиц при нанесении хроматографируемого образца.

Чтобы уравновесить колонку, ее промывали тем же буферным раствором, каким велась элюция на первом этапе, т.е для анионной хроматографии- буферным раствором трис-HCl в концентрации 0,2 М с рН = 9 для анионной, и для катионной - Na-ацетатным в концентрации 0,2 М с рН = 4,2 . Чтобы уменьшить время уравнивания, был использован 10-кратный объем колонки начального буферного раствора. На этом, подготовительный этап считается законченным и можно переходить непосредственно к хроматографированию, используя те же буферные растворы, как и во время уравнивания сорбента. Содержание белка во фракциях определяется колориметрически методом Лоури, а реакцией Селиванова —содержание углеводов.

2.3 Метод Лоури

После ионообменной хроматографии используется метод Лоури для количественного определения во фракциях содержания белка. Метод основывается на реакции с пептидной связью ионов меди Cu^{2+} , которые при этом переходят в Cu^+ , а затем реагируют с фосфомолибденовой кислотой и фенолом (реактив Фолина-Чокальтеу). Образованный неустойчивый продукт переходит в молибденовую синь, максимальная адсорбция которой наблюдается при $\lambda = 750$. Увеличение концентрации белка при данной длине волны зависит от показателя оптической плотности линейно. У метода высокая чувствительность, поскольку адекватные значения появляются для концентраций белка от 10 до 100 мкг/мл. [8].



Рис. 6. Схематическое изображение алгоритма проведения метода Лоури

Из каждой фракции, собранной после ионообменной хроматографии, отбиралась аликвота объёмом 0,5 мл, к аликвоте прибавлялся реактив С в количестве 1 мл (реактив С представляет собой смесь реактива В (0,5%-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м растворе тартрата или цитрата натрия) и А (2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH) в соотношении 50:1), затем содержимое пробирки необходимо тщательно перемешать и инкубировалась смесь при комнатной температуре в течение 10 минут. По истечении данного времени, прилить 100 мкл реактива Фолина-Чокальтеу и, предварительно перемешав, инкубировать в течение 40 минут при комнатной температуре.

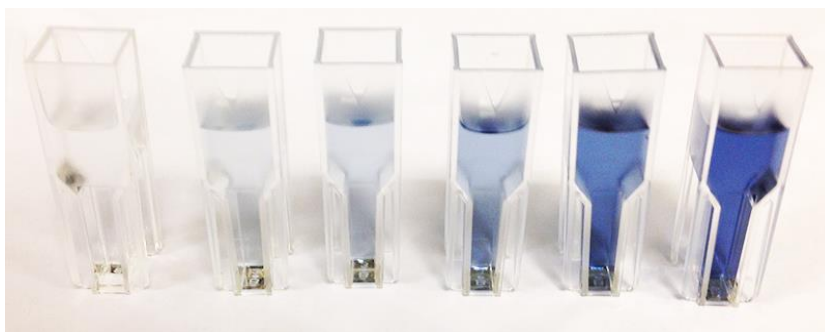


Рис. 7. Фракции после сорокаминутного инкубирования с реактивом Фолина-Чокальтеу

На фотоэлектроколориметре КФК-3 при длине волны $\lambda = 750$ нм проводилось измерение оптической плотности в кювете толщиной 1 см против холостой пробы. Концентрация белка в каждой пробе была определена по полученным значениям оптической плотности с помощью построенного с использованием БСА градуировочного графика.

2.4 Реакция Селиванова

Для определения наличия углеводов в пробе использовалась реакция Селиванова. Эта реакция является качественной для своеобразных маркёров наличия углеводов в пробе- фруктозы или других кетоз, но не альдоз, у которых скорость реакции намного ниже. Реакция основана на образовании оксиметилфурфурола при взаимодействии фруктозы с крепкой соляной или любой минеральной. В присутствии резорцина оксиметилфурфурол окрашивается в характерный вишнево-красный цвет. После ионообменной хроматографии из каждой фракции забиралась аликвота объемом 0,5 мл, в которую добавляют 0,1%-й спиртовой раствор резорцина в объеме 0,5 мл и 1,5 мл 30% HCl, потом смесь ставилась в кипящую водяную баню для инкубации на 8 минут.

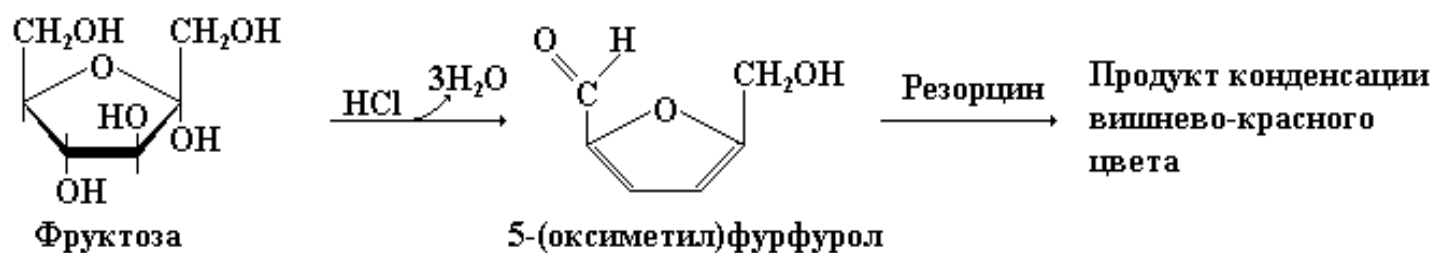


Рис. 8. Схема протекания реакции Селиванова

На фотоэлектроколориметре КФК-3 интенсивность окраски измерялась против холостой пробы в кювете толщиной стенок 1 см при длине волны $\lambda = 490$ нм. На основе полученных значений адсорбции был составлен график.

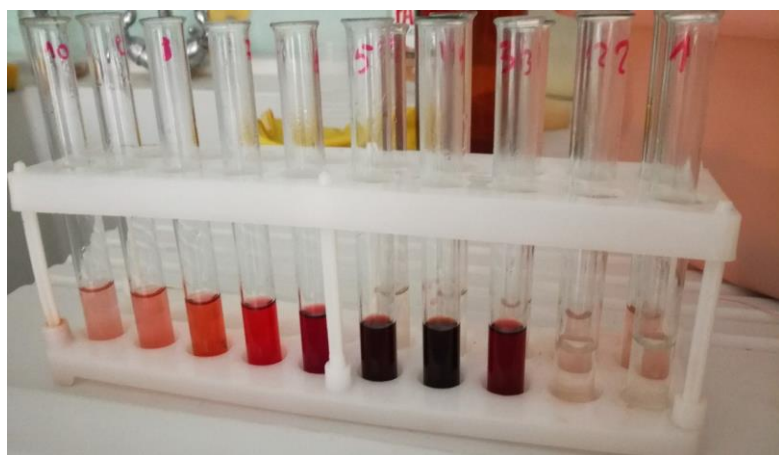


Рис. 9. Окраска фракций с продуктом конденсации реакции Селиванова



Рис.10 . Фотоэлектроколориметр КФК-3

2.5 Лиофилизация

Лиофильная сушка- это метод высушивания под вакуумом биологических объектов в замороженном состоянии. Путём испарения льда, вода из замороженного материала удаляется минуя жидкую фазу и не нарушая нативную структуру белков. Устойчивость лиофилизированного препарата к воздействиям внешней среды, а также сохранение на длительное

время всех физико-химических свойств, достигается за счет замедления или прекращения биохимических реакций в материале. Лиофилизация биологических препаратов производится в стеклянных ампулах, флаконах и противнях. Наилучшие условия замораживания и дальнейшего высушивания, достигаются за счет соответствия температуры замораживания с эвтектической температурой раствора [33]. В этих условиях, при полной заморозке, отношение поверхности к объему замороженного материала будет максимальным. Это обеспечивает при минимальной толщине слоя наибольшую поверхность сублимации. Лиофилизированные препараты не изменяют свой первоначальный объем, а во время соприкосновения с водой достаточно быстро растворяются [47]. Данный метод отлично подходит для безопасного концентрирования пептидных препаратов за счет выпаривания воды, поскольку полученный в результате ионнообменной хроматографии раствор содержит недостаточную концентрацию пептидов для дальнейшего анализа на иммуностропность. Разведя сухой пептидный препарат в 200 мкл воды, получила раствор с концентрацией пептидов 400 мкг/мл.

2.6 Тестирование препарата на иммуностропность

2.6.1 Приготовление препарата

Раствор анионных пептидов, участвующий в тесте на иммуностропность состоит из слитых вместе многократно собранных после ионообменной хроматографии фракции с анионными пептидами. Но в растворе конечная концентрация пептидов оказалась не достаточной для дальнейших исследований, всего 55,3 мкг/мл, поэтому раствор методом выпаривания предварительно концентрировался. Используемая температура +80° С исключала возможную разложение и/или термическую денатурацию пептидов. После данной процедуры, содержание пептидов в растворе

увеличилось до 395,6 мкг/мл, что для дальнейших исследований было приемлемо.

2.6.2 Метод исследования

В соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств Министерства здравоохранения и социального развития РФ, разработанного в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», были проведены исследования на иммуностропность пептидного препарата [16].

Белых мышей одного пола разделили на несколько групп: интактная группа, группа А - контрольная группа, которым вводился цитратный буферный раствор, группе В1 — препарат в концентрации 10 мкг/мл + культура *E. coli*, группе В2 — препарат в концентрации 100 мкг/мл + культура *E. coli*, группе В3 — препарат в концентрации 400 мкг/мл + культура *E. coli*, группе В — культура *E. coli*.

В группе В каждой мыши вводился внутрибрюшинно препарат в объёме 0,2 мл Na-цитратного буферного раствора (рН = 6) с заданной концентрацией пептидов, затем, через 48 часов производилась внутрибрюшинная инъекция в объёме 0,2 мл с концентрацией 1 млрд. клеток в 1 мл чистой культуры *Escherichia coli*. Мышам из группы В патогенную культуру вводили в одно и тоже время с группой В, одновременно с группой В вводился Na-цитратный буферный раствор (рН = 6) группе А. Наблюдение за мышами велось в течение 10 дней, за это время они находились в одинаковых условиях и получали одинаковое питание.

2.7 Создание модели иммунодефицита

Иммуностропность пептидного препарата мёда, полученный путем ультрафильтрации оценивали с помощью модели острого бронхолегочного воспаления, вызванного у лабораторных мышей введением в трахею 0,1 мл

скипидара [14]. Непосредственно после манипуляции, а затем в течении 5ти дней, животным из опытной группы вводили внутривбрюшинно изучаемый иммуностимулирующий пептидный препарат. На пятые сутки эксперимента для забора материала для иммунологических и биохимических исследований животные подверглись декапитации.

Лимфоциты в биохимических методах исследований выделяли в градиенте плотности фикол-уротраст из цельной крови крыс. Взвесь лимфоцитов, использованная в работе, при контроле на их жизнеспособность содержала 2×10^6 клеток в 1 мл. Содержание пировиноградной и молочной кислот определяли в лимфоцитах крови и в 10 %-м гомогенате ткани легкого, приготовленном на 6N хлорной кислоте, энзиматическим методом в модификации И. В. Зарубиной [13] по E. Marbach и M. Weil [11, 12].

Иммунологические исследования проводили, инструктируясь «Методическими материалами по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств» [19].

Клеточное звено иммунитета анализировалось по определению характеризующей функциональное состояние Т-лимфоцитов реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с фитогемагглютинином (ФГА) и конканавалином А (Кон-А). По уровню нейтрофильного фагоцитоза по отношению к микробной тест-культуре после их совместной инкубации оценивали состояние механизмов неспецифической защиты организма.

В экспериментах пептидные препараты вводили животным внутривбрюшинно каждый день на протяжении пяти суток в оптимальной эффективной дозе 40 мг/кг массы тела. Контрольные группы животных получали в эквивалентном объеме физиологический раствор.

2.7.1 Влияние пептидов меда на показатели гуморального иммунитета

С помощью метода локального гемолиза определяли количество клеток, образующих антитела, — это безгелевый вариант локального гемолиза [16]. Все опыты выполнялись на лабораторных мышах массой 18–21 г. Пептидный раствор, очищенный от высокомолекулярных веществ, внутрибрюшинно вводили в дозе 40 мг/кг. В качестве антигенной нагрузки использовали эритроциты барана 2×10^8 . В течение 3х дней животные получали пептидный препарат, а на 5-е сутки их забивали декапитацией, извлекали селезенку для приготовления гомогената.

Для изучения действия пептидов меда на реакцию преципитации препарат в дозировке 40 мг/кг в течение 7 дней вводили внутрь. Затем животных иммунизировали путем внутрибрюшинного введения 1 %-го раствора эритроцитов барана в объеме 0,25 мл. Сделать вывод о выраженности гуморального иммунного ответа позволили гемагглютинины, обнаруженные в сыворотке крови мышей. Реакцию ставили на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации (коэффициент рассчитали из значений log-титра). Моделировали иммунодепрессивное состояние введением 40 мг/кг аллоксана внутрибрюшинно за трое суток до забоя.

2.7.2 Влияние пептидов меда на интерфероногенез

Опытных мышей разделили на три группы. Первой группе (контрольной) внутрибрюшинно вводили плацебо, второй- пептидный препарат меда, а третьей- положительный контроль, вызывающий повышение уровня интерферонов. Через 6 и 24 часа после введения исследовали мышиную сыворотку крови.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Предварительная обработка меда для начала исследования

Для приготовления раствора меда для дальнейших исследований, 100 г мёда растворяется в 1 литре воды. Для измерения концентрации белка по методу Лоури и концентрации фруктозы с помощью реакции Селиванова, строила калибровочные графики, представленные на Рис.11 и Рис. 12.

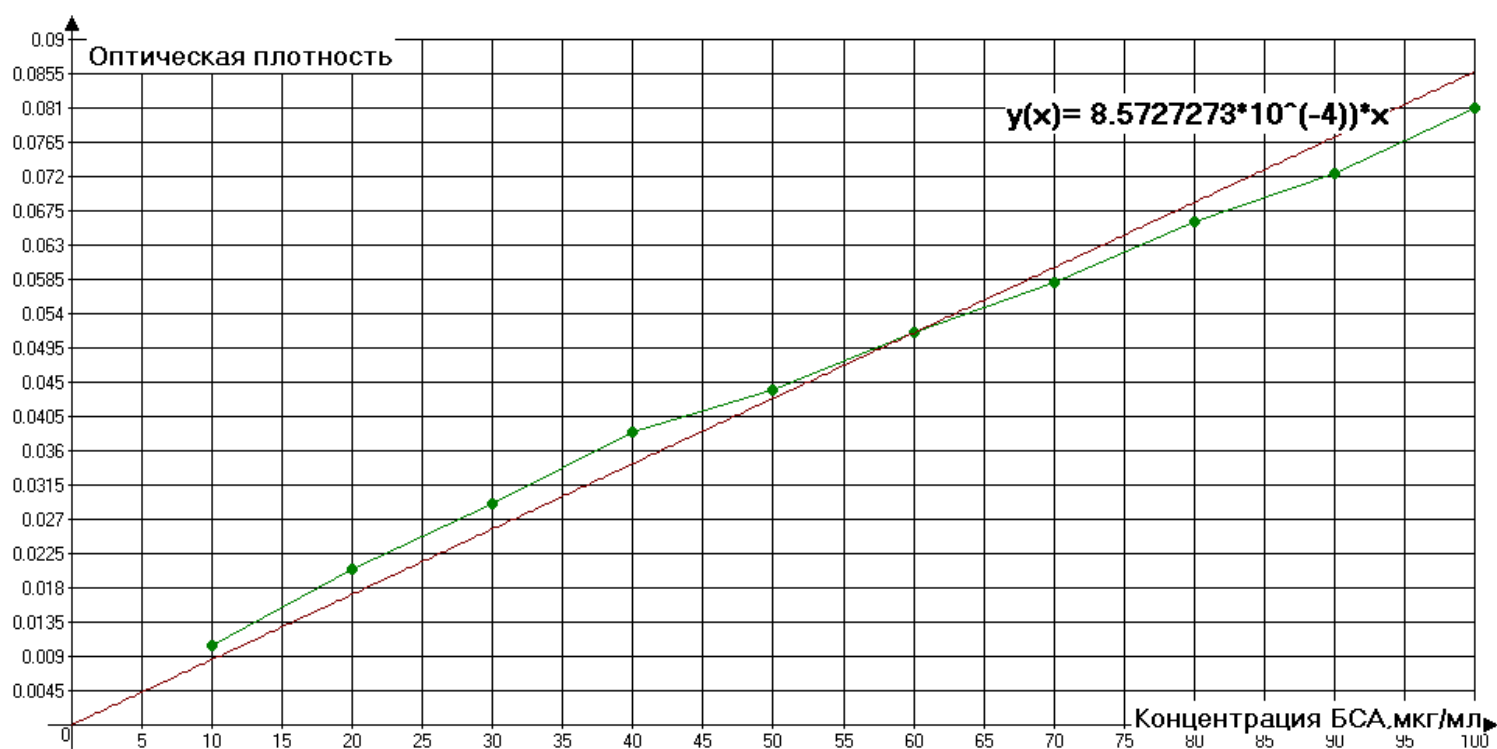


*Рис. 11. Калибровочный график зависимости оптической плотности
от концентрации пептидов. Метод Лоури.*

Таблица. 1.

Содержание белка, определенное методом Лоури, в растворе меда
(разведенный в 10 раз)

Номер пробирки	1	2	3	4	5
Концентрация пептидов, мкг/мл	38	37	35,6	38,2	37,9
Оптическая плотность	0,4	0,39	0,381	0,403	0,395
Среднеквадратическое отклонение	0.89443				

Высчитав среднее значение, приходим к выводу, что содержание белка в исследуемом растворе меда составляет 37,5 мкг/мл

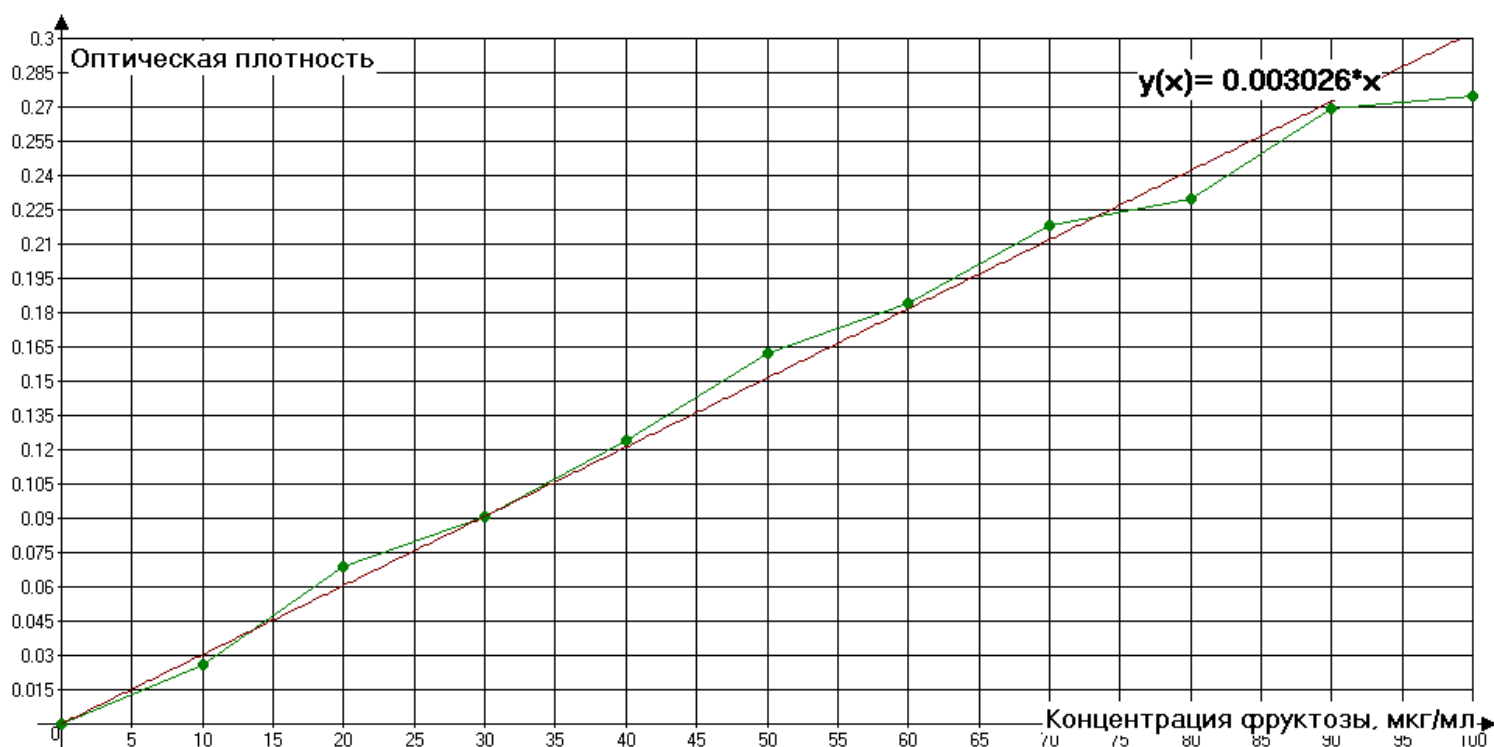


Рис. 12 . Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации фруктозы в растворе меда. Реакция Селиванова.

После проведенных расчетов было выяснено, что содержание фруктозы в исследуемом образце меда составило 42%, что соответствует нормам.

3.2 Ультрафильтрация на установке VivaFlow

После проведения ультрафильтрации, из отобранного осадка с пептидами брали пробу на метод Лоури, чтобы узнать концентрацию пептидов, оставшихся после очистки от высокомолекулярных соединений.

Таблица 2.

Определенное методом Лоури содержание пептидов массой от 5 до 10 кДа.

Номер пробирки	1	2	3	4	5
Концентрация пептидов, мкг/мл	20,69	19,25	17,5	20	19,25
Оптическая плотность	0,21	0,19	0,183	0,2	0,19
Среднеквадратическое отклонение	1.14018				

Как видно из Таблицы 2, содержание белкового компонента уменьшилось, и его среднее значение стало равно 19,34 мкг/мл.

3.3 Хроматографическое разделение

На колонку микродозатором под большой столб начального элюента наносился в объеме 0,5 мл раствор мёда, состоящий из смеси пептидов, углеводов мёда, пигментов и других молекул с массой меньше 10 кДа, приготовленный в соответствии с методикой описанной в п. 2.1.2.. Осторожность при выполнении данных манипуляций связана с тем, что в

силу разницы плотностей разделяемая смесь осталась внизу, а значит необходимо исключить перемешивание. После этого обеспечивался равномерный приток начального буферного раствора и собирались фракции по 2 мл, скорость элюции — 2 мл/м.

3.3.1 Анионная хроматография

При анионной хроматографии после сбора десятой фракции элюцию останавливали, аккуратно удаляли верхний слой лишнего начального буферного раствора (трис- HCl) и обеспечивали равномерный приток буферного раствора для десорбции (Na-цитратная буферная система, 0,2 М, рН = 6). И возобновляли сбор фракций при тех же условиях, пока не было собрано ещё 10 фракций. А затем измерили концентрацию белка по методу Лоури и концентрацию фруктозы с помощью реакции Селиванова.

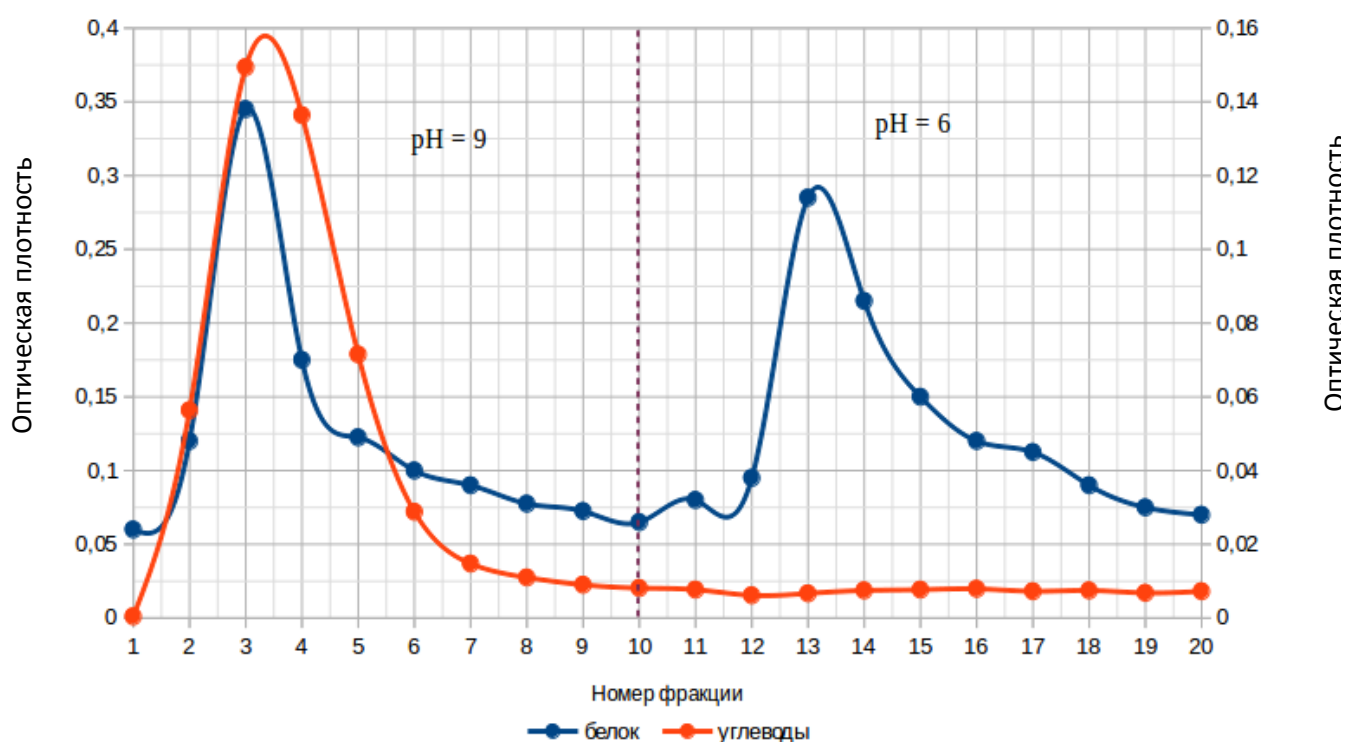


Рис. 13. Графическое изображение профиля элюции пептидов при анионной хроматографии (дополнительная ось в масштабе белка)

3.3.2 Катионообменная хроматография

Уравновешивание колонки при катионной хроматографией велось начальным буферным раствором (Na-ацетатная буферная система с концентрацией 0,2 М и $\text{pH} = 4,2$). После сбора восьмой фракции элюент меняли на Na-цитратный буферный раствор с концентрацией 0,2 М и $\text{pH} = 6$, а после сбора тринадцатой фракции в последний третий раз элюент заменяли на 0,2 М трис-HCl буферный раствор с $\text{pH} = 9$. Условия для разделения, а именно скорость элюции, объём носителя, объём фракции, используются те же, что при анионной хроматографии.

Использование вместо одного двух буферных растворов для десорбции катионных пептидов, объясняется более эффективным разделением в зависимости от заряда группы катионных пептидов. При катионообменной хроматографии профиль элюции имеет три пика, а не два, что можно объяснить использованием трёх буферных растворов вместо, соответственно, двух. Сорбции углеводов при таком способе разделения пептидов не происходит, поскольку они вместе с несвязавшимися пептидами выходят в свободном объёме колонки. Пики чётко видны после каждой смены буферного раствора, это доказывает, что в мёде содержится три группы пептидов: катионные, анионные, нейтральные, среди которых самой многочисленной оказалась первая группа. Из Графика видно, что примерная суммарная концентрация двух групп сорбировавшихся пептидов меньше концентрации несорбировавшихся пептидов, вышедших в свободном объёме колонки. Это объясняется изменением параметров колонки, а именно отношением длины к диаметру, что также на оптимальный наносимый объём раствора мёда.

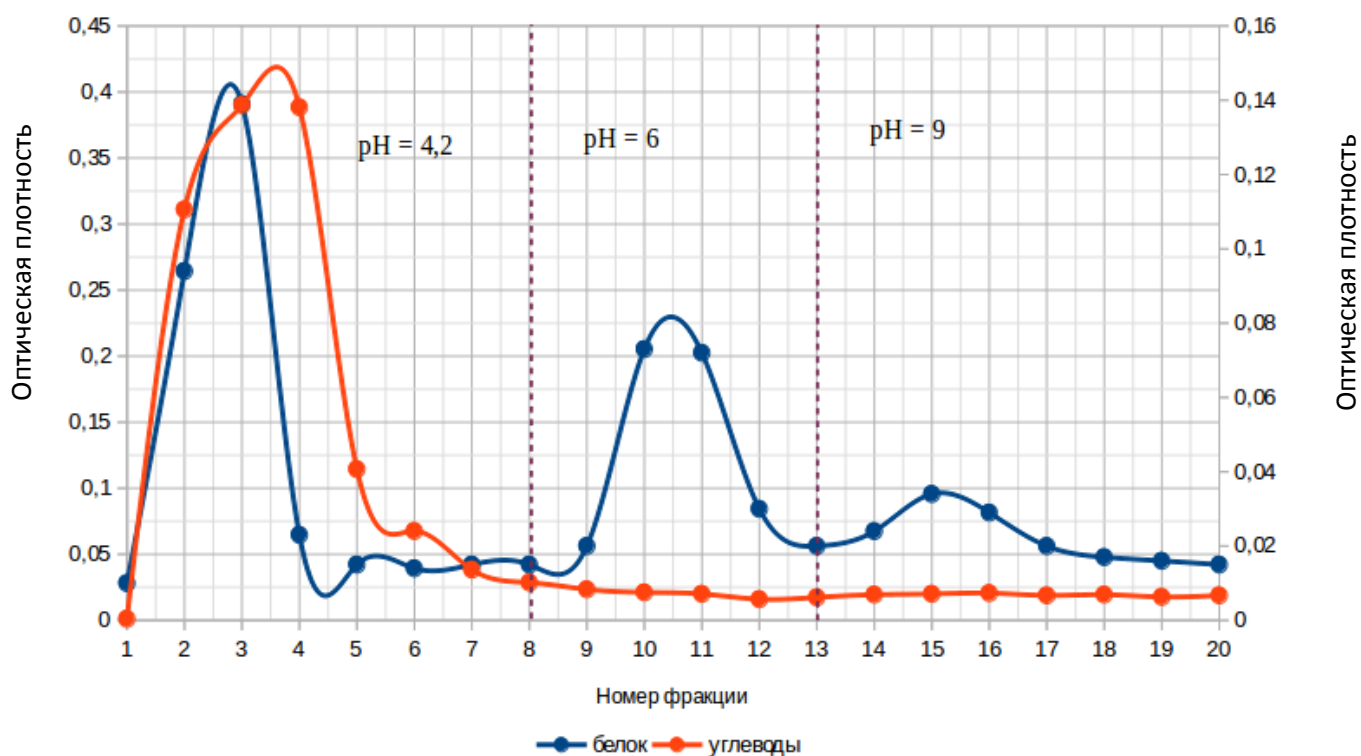


Рис. 14. Графическое изображение профиля элюции пептидов в объеме при катионной хроматографии (дополнительная ось в масштабе белка)

3.4 Тест на иммулотропность

Белые мыши одного возраста были разделены на несколько групп для проведения теста на неспецифическую резистентность организма.

Таблица 3.

Распределение мышей на группы

Количество мышей	Группа	Дозировка препарата
10	Интактная группа	-
10	А	контрольная группа (цитратный буферный раствор)
10	Б2	препарат в концентрации 100 мкг/мл+культура E. coli

Количество мышей	Группа	Дозировка препарата
10	Б3	препарат в концентрации 400 мкг/мл + культура E. coli
10	В	культура E. coli

Таблица 3 (продолжение).

Группе А — контрольной — вводился цитратный буферный раствор (рН = 6), подгруппе Б1 — препарат в концентрации 10 мкг/мл, подгруппе Б2 — препарат в концентрации 100 мкг/мл, подгруппе Б3 — препарат в концентрации 400 мкг/мл. Через 48 часов группе Б и В была введена культура кишечной палочки в концентрации 1 млрд. клеток/мл. Все инъекции проводились внутривентрально и в объеме 0,2 мл.

Результаты теста на выживаемость приведены в Таблице 4 и соответствуют критериям, указанным в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [12]: смертность группы В не менее 90% (в данном случае из-за небольшого размера группы результат 7 из 10 подходит под критерий «90%»), минимальная численность группы — 6 особей, выживаемость особей из группы с препаратом — не менее 60%.

Таблица 4.

*Результаты исследования препарата на иммуностимуляцию
(выживаемость)*

Группа	Доза введения	Количество выживших особей	Выживаемость в процентах
Группа А - контрольная	0,2 мл цитратного буферного раствора	10	100%

Группа	Доза введения	Количество выживших особей	Выживаемость в процентах
Группа Б1	Препарат в концентрации 10 мкг/мл + E. coli	10	100%
Группа Б2	Препарат в концентрации 100 мкг/мл + E. coli	8	80%
Группа Б3	Препарат в концентрации 400 мкг/мл + E. coli	0	0%
Группа В	E. coli 1 млрд. клеток/мл	2	20%

Таблица 4 (продолжение).

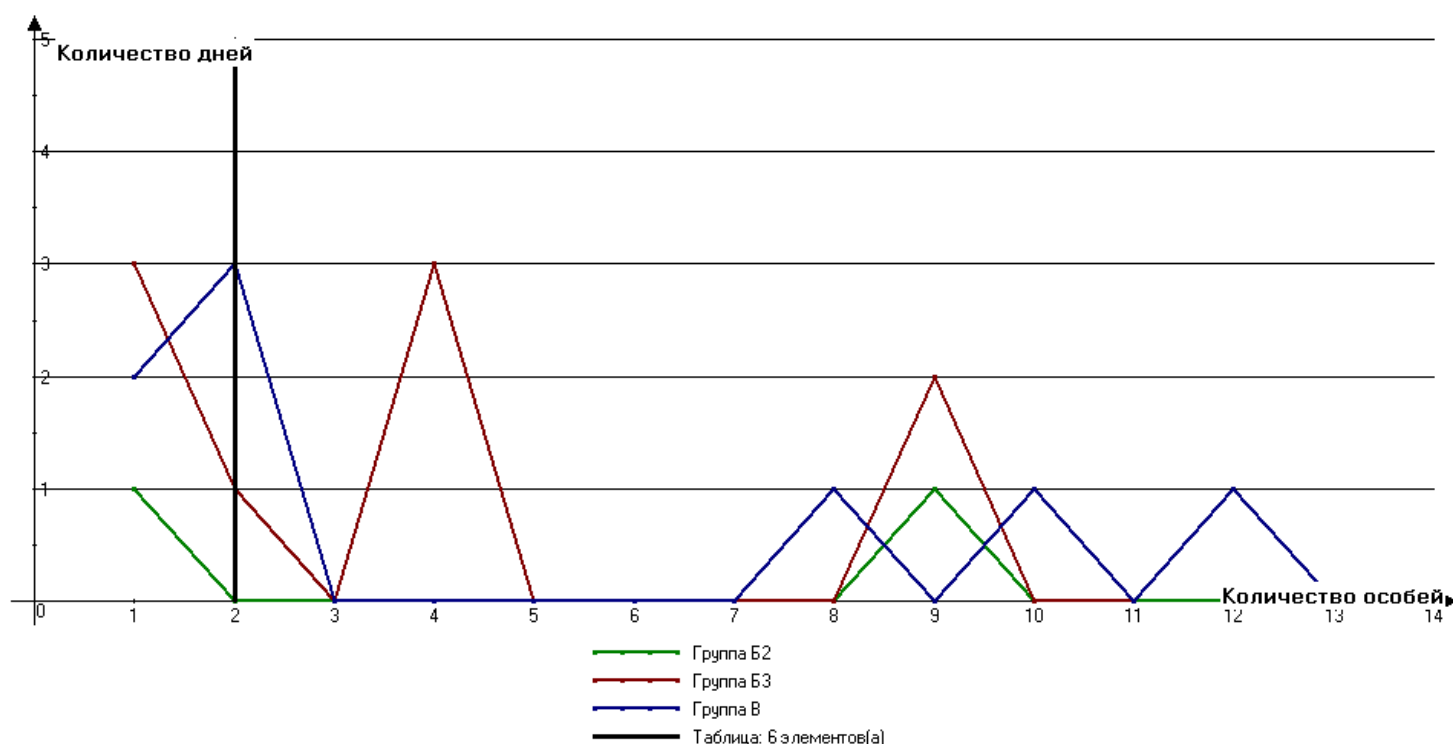


Рис. 15. Дневная динамика смертности мышей. Из графика исключены группы А и Б1, т. к. процент смертности в этих группах нулевой. Первые два дня исследования отграничены линией для наглядного отображения того факта, что большинство мышей с введённым препаратом в концентрации 400 мкг/мл умерли ещё до того, как им ввели патоген.

На тот факт, что высокая концентрация препарата оказывает токсическое действие указывает низкий процент выживаемости в подгруппе Б3. Обзор исследований на эту тему доказывает, что путём формирования пор в нейронах (нейротоксичность) или ингибированием поверхностных ферментативных комплексов эритроцитов (гемотоксичность) высокие концентрации антибактериальных пептидов могут оказывать токсическое действие [35]. Нельзя игнорировать и тот факт, что повышается иммуностропное действие препарата из пептидов мёда при повышении концентрации пептидов-эффекторов, т. е. имеет аддитивный характер, что также оказывает на организм токсическое действие путём повышения активности иммунной системы, что может повлечь за собой развитие скоротечных аутоиммунных синдромов.[43] Выживаемость оценена на

«хорошо» и «отлично» (подгруппы Б2 и Б1 соответственно) в подгруппах с меньшими концентрациями.

3.4.1 Влияние пептидного препарата на показатели клеточного иммунитета мышей

Исследование воздействия препарата на вес селезенки и тимуса (Таблица 5) показало, что пептидный препарат мёда, введенный в дозе 40 мг/кг, на массу тимуса влияния не оказывал, но спровоцировал увеличение массы селезенки.

Таблица 5.

Влияние пептидов меда на массу тимуса и селезенки мышей

Группа	Масса тимуса, мг	Масса селезенки, мг
Контроль	24,7 ± 1,7	80,2 ± 4,3
Пептиды мёда	25,6 ± 1,5	100,6 ± 6,8*
Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с показателем в контроле.		

Как видно на Таблице 6, под влиянием пептидного препарата, процентное содержание в селезенке Т-лимфоцитов увеличивалось. Содержание Т- и В-лимфоцитов в контрольной группе осталось без изменения.

Таблица 6

Влияние пептидного препарата меда на содержание Т- и В-лимфоцитов в селезенке мышей

Группа	Количество лимфоцитов (%)	
	Т-лимфоциты	В-лимфоциты
Контроль	36,4 ± 1,25	51,2 ± 1,65
Пептиды	43,1 ± 1,72*	49,1 ± 2,59
Примечание. * — $p < 0,01$ по сравнению с показателем в контроле.		

Таким образом, иммуностимулирующие пептиды мёда оказывают влияние на перераспределение в организме мышей лимфоидных клеток.

3.4.2 Влияние пептидов мёда на показатели гуморального иммунитета

Методом локального гемолиза, благодаря которому возможно количественно определить образующие антитела клетки, установлено, что иммунный ответ по гуморальному типу пептидный препарат стимулирует на 69 %. Проанализировав результаты реакции гемагглютинации, выяснилось, что у группы животных, которые получали пептиды, нарастание титра антител максимума достигает на 14-е сутки — 4,21. На фоне умеренной депрессии иммунной системы в группе животных с экспериментальным диабетом (0,73) предварительное введение животным препарата сопровождается увеличением титра антител на 14-е сутки — 3,31.

Факторы, перечисленные выше, указывают на иммуностимулирующие свойства пептидов меда, связанные с увеличением пролиферативной активности В-лимфоцитов.

Таблица 7

Влияние пептидного препарата меда на первичный гуморальный иммунный ответ у мышей разных генотипов

Линия мышей	Доза пептидов, мг/кг	Количество АОК на селезенку
СВА	—	88943 ± 5692
	4	149220 ± 14624**
	40	174003 ± 16921**
	400	124106 ± 4598*

Линия мышей	Доза пептидов, мг/кг	Количество АОК на селезенку
В6 Д2F1	—	3599 ± 49896
	4	$55834 \pm 6671^*$
	40	$86021 \pm 9814^{**}$
	400	$70763 \pm 7117^*$
Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ в сравнении с исходными данными.		

Таблица 7 (продолжение).

При однократном внутрибрюшинном введении пептидного препарата за 1 сутки до иммунизации, наблюдается дозозависимая стимуляция IgM-антителообразования на Т-зависимый антиген у низкоотвечающих (линия В6 Д2F1) и высоко- (линия СВА) мышей. Из Таблицы видно, что максимальный двукратный эффект проявляется при использовании пептидов меда в дозе 40 мг/кг.

3.4.3 Влияние пептидов меда на интерфероногенез

В сыворотке крови животных при введении им плацебо (контрольная группа) концентрации интерферонов выявлены минимальные. После внутрибрюшинного введения в течение 24 часов в среднем определялось не более 2,1 ИЕ/мл гамма и 2,0 ИЕ/мл альфа-интерферона. Аналогичное введение мышам пептидов меда приводило, по сравнению с группой плацебо, к существенному ($p < 0,05$) повышению уровня интерферона у животных уже через 6 часов. За это время образовывалось 25,01 ИЕ/мл интерферона, устойчивого к прогреванию (альфа-типа) и к изменению pH.

Гамма-интерферон рассчитывают по разнице общего и альфа-интерферона. Его значение было в пределах 8 ИЕ/мл, а содержание от группы плацебо достоверно не отличалось. Изменялось данное соотношение спустя сутки.

Показатель альфа-интерферона оказывался минимальным, в среднем — 6,4 ИЕ/мл, а гамма-интерферон значительно увеличивался до 26,7 ИЕ/мл ($p < 0,05$).

В аналогичных условиях, полинуклеотид И: Ц (положительный контроль) индуцировал только альфа-интерферон, достигающий по истечению 6 часов уровня в 166 ИЕ/мл, что намного выше ($p < 0,05$), чем в опытной группе. Содержание интерферона в сыворотке крови мышей снижалось до уровня плацебо через 24 часа.

Таблица 8

*Индукция альфа- и гамма-интерферона пептидами меда у мышей при
внутрибрюшинном введении препарата*

Группы мышей	Титры интерферонов в сыворотке после внутрибрюшинного введения препарата, ИЕ/мл			
	через 6 ч		через 24 ч	
	альфа-тип	гамма-тип	альфа-тип	гамма-тип
Пептиды меда	25,01 ± 9,1*#	8 ± 4,3	6,4 ± 1,5*#	26,7 ± 8,2*#
Контроль (плацебо)	2,0 ± 1,4	2,1 ± 2,1	1,4 ± 1,4	0,3 ± 0,3
Положительный контроль (полинуклеотид И: Ц)	160,6 ± 10,2*	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,6	1,6 ± 1,0
Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с показателем в контроле (плацебо). # $p < 0,05$ по сравнению с показателем положительного контроля				

Первичная оценка в опытах на белых мышах способности иммуностимулирующего фактора меда индуцировать сывороточный интерферон показала, что он обладает интерфероногенной активностью. После внутрибрюшинного введения пептидного препарата меда в первые часы вырабатывается интерферон альфа-типа, замещающийся гамма-интерфероном через сутки. Выявленная у иммуностимулирующих пептидов

меда интерфероногенная активность, позволяет расширить сферы их применения и создать на их основе медицинские препараты с направленным спектром действия. Углубленное изучение пептидов меда целесообразно в связи с тем, что они провоцируют индуцирование гамма-интерферона, который имеет по сравнению с другими видами интерферона больше возможностей для иммуномодулирующего действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на результатах исследования можно сказать, что препарат пептидов мёда в концентрациях до 100 мкг/мл проявляет иммуностимулирующую активность и является иммуотропным средством.

В больших концентрациях (как минимум ≥ 400 мкг/мл) проявляется токсический эффект вводимого препарата, что может привести к летальному исходу или осложнениям.

В ходе выполнения ВКР:

1. Разработан метод выделения иммуностимулирующего препарата из мёда.
2. Дана качественная и количественная характеристика пептидного спектра мёда.
3. Доказана иммуностимулирующая активность препарата пептидов мёда, а также способность пептидов в высоких концентрациях оказывать токсическое действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айвазов, Б. В. Практическое руководство по хроматографии / Б. В. Айвазов. — М.: Высшая школа—1968— 99с.
2. Базарный, В.В. Сравнительная оценка действия миелопида и Т-активина на костный мозг / В.В. Базарный, А.В. Осипенко // Бюл. экспер. биологии и медицины. —1993—Т 115, № 3—С.25—39
3. Беленький, Б. Г. Хроматография полимеров./ Беленький Б. Г., Виленчик Л. З. // М.: Химия— 1978, —С.13—14
4. Белокрылов, Г.А. Сходство иммуно-, фагоцитозмодулирующих и антиоксических свойств дипептидов и составляющих их аминокислот / Г.А. Белокрылов, О.Я. Попова, Е.И. Сорочинская // Бюл. экспер. биологии и медицины. —1999. —Т 127. — № 6. —С.12—24
5. Бобиев, Г.М. Синтез и структурно-функциональное исследование иммуноактивных пептидов ряда тимопоэтина, тимозина, бурсина: Автореф. дис. канд. хим. наук./ Бобиев Г.М. — Душанбе, 1996. —24 с
6. Виноградова, Т. В. Пчела и здоровье человека / Т. В. Виноградова, Г. П. Зайцев. — М: Россельхозиздат, 1966. — 288 с.
7. Гробов, О. Ф. Болезни и вредители медоносных пчёл / О. Ф. Гробов, А. М. Смирнов, Е. Т. Попов. — М.: Агропромиздат, 1987. —335с.
8. Доусон, Р. Справочник биохимика / Р. Доусон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. — М.: Мир, 1991. —544 с
9. Доценко, Э. А. Иммунодефициты и некоторые иммуномодулирующие средства / Э. А. Доценко, Д. А. Рождественский, Г. И. Юпатов // Вестник ВГМУ. — 2014. —Т. 13, №3—С. 103—120
10. Дранник, Г.Н. Иммуотропные препараты / Г.Н. Дранник, Ю.А. Гриневич, Г.М. Дизик // Киев: Здоров'я, 1994—228с
11. Зарубина, И. В. Разделение и прямое количественное определение адениннуклеотидов на силуфоле/ Зарубина И. В., Криворучко Б. И.// Укр. биохим. журнал. — 1982. —Т. 54, № 4. — С.437—439

12. Зарубина, И. В. Молекулярная фармакология антигипоксантов./ Зарубина И. В., Шабанов П. Д. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2004 –368 с
13. Зарубина, И. В. Антигипоксанты при черепно-мозговой травме. / Зарубина И. В., Нурманбетова Ф. Н., Шабанов П. Д. – СПб.: Элби-СПб, 2006. – 208 с.
14. Кулик, А. М. Регуляция дыхания и легочного кровообращения при экспериментальной пневмонии // Бюл.эксперим. биол. и мед. – 1986. – № 2. – С.144–146.
15. Лебедев, К. А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: Медицинская книга, 2003. – 443 с.
16. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Коллектив авторов под председательством А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012– 10 с
17. Новикова, И. А. Современные аспекты иммунодиагностики и иммунокоррекции в гнойной хирургии / И. А. Новикова, В. П. Булавкин. – Витебск, 2001. – 140 с.
- 18.Новикова, И. А. Вторичные иммунодефициты: клинико-лабораторная диагностика (лекция) / И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. – 2009. –Т.19, №1. – С. 29-34.
- 19 Фисенко, В. П. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/Под ред. В. П. Фисенко. – М.: Ремедиум, 2000. – С. 281–286.
20. Хаитов, Р. М. Иммунология / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, Г. И. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.
21. Чучалин, А. Г. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств: (формулярная система)/А. Г. Чучалин, Ю. Б. Белоусов, В. В.Ясенцев. – Вып. XII. – М., 2011. – 938 с.
22. Шеметков, М.Ф.Продукты пчеловодства и здоровье. / Шеметков, М.Ф., Шапиро Д.К, Данусевич И.К. – Минск: Ураджай, 1987. – 52 с.

23. Ширинский, В. С. Проблемы иммуностимулирующей терапии с позиции доказательной медицины / В. С. Ширинский, Н. М. Старостина, Ю. А. Сенникова, И. В. Ширинский, Н. Ю. Соловьёва, О.А. Малышева, О. Л. Круглеева, В. М. Непомнящих // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, №1. – С. 17–24.

24. Abu Taib Mohammad Mobarok Ali. Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori* / Abu Taib Mohammad Mobarok Ali, Mohammad Nurul Haque Chowdhury, Mohammad Saad Al Humayyd // Tropical gastroenterology. – 1991. – Vol. 12, №3. – P. 139–142.

25. Brogden, K. A. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. / Brogden, K. A., Ackermann, M. Huttner, K. M. // Antimicrob. Agents Chem. – 1997 – Vol. 41 – P. 1615–1617.

26. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors on bacteria? / K. A. Brogden // Nature. – 2005. – Vol. 3.

27. Riddell, C.E. Pathways to immunity: temporal dynamics of the bumblebee (*Bombus terrestris*) immune response against a trypanosomal gut parasite Insect / C.E. Riddell, S. Sumner, S. Adams, E.B. Mallon // Mol. Biol., – 2011 – Vol. 20, №4. – P 529–540.

28. Casteels, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst // The EMBO Journal. – 1989. – Vol. 8, №8. – P. 2387–2391.

29. Casteels, P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). / Casteels P., Ampe Ch., Riviere L., Van Damme J., Elicone Ch., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. // Eur. J. Biochem. – 1990 – Vol 187, № 381. – P. 386.

30. De, Y. the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells / Y. De, Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters // J Exp Med. – 2000. – Vol. 7, №192. – P. 1069–1074.

31. DiMarcq, J. L. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A / J. L. DiMarcq, E. Keppi, B. Dunbar, J. Lambert, J.-M. Reichhart, D. Hoffmann, S. M. Rnkine, J. E. Fothergill, J. A. Hoffmann // *European Journal of Biochemistry*. – 1988. – Vol. 171, Issue 1-2. – P. 17–22.

32. 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. 5, №15 –P. 33-41.

33. Flosdorf E. W. Freeze – Drying. / Reinhold Publishing Corp. – New York, 1949. –P. 2–25.

34. Gennaro, R. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides / Gennaro, R., Zanetti, M.// *Biopolymers*– 2000– Vol.55, № 31–49p.

35. Hancock, E. W. R. Antimicrobial and host-defence peptides as new antoinfective therapeutic strategies / E. W. R. Hancock, H.-G. Sahl // *Nature Biotechnology*. – 2006. – №24. – P. 1551–1557.

36. Hoffmann, J. A. The immune response of *Drosophila* / J. A. Hoffmann // *Nature*. – 2003. – Vol. 426, №5–P. 23–33.

37. Lai, Y. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense / Y. Lai, R. L. Gallo // *Trends in Immunology*. – 2009 – Vol. 30, Issue 3. – P. 131–141.

38. Li W. F. Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action./ Li W. F., Ma G. X., Zhou X. X.// *Peptides*– 2006–№27–P. 2350–2359.

39. Madani F. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides / Madani F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Graslund, A. // *J. Biophys.* — 2011— 414729.

40. Markossian K. A. Antibacterial proline-rich oligopeptides and their target proteins./ Markossian K. A. , Zamyatnin A. A. , Kurganov B. I. // Biochemistry (Mosc) – 2004– № 69 –P. 1082–1091.
41. Otvos, Jr. L. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides / L. Jr Otvos, I. O, M. E. Rogers, P. J. Consolvo, B. A. Condie, S. Lovas // Biochem. – 2000. – №39. – P. 14150–14159.
42. Rahnamaeian M., Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria/ M. Cytryńska, A. Zdybicka-Barabas, K. Dobslaff, J. Wiesner, R.M. Twyman, T. Zuchner, B.M. Sadd, R.R. Regoes, P. Schmid-Hempel, A. Vilcinskas //Proc. Biol. Sci., –2015– Vol.1806, № 282 –P. 65-70.
43. Rahnamaeian M. The functional interaction between abaecin and pore-forming peptides indicates a general mechanism of antibacterial potentiation./Rahnamaeian M, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A, Vilcinskas A. Peptides// j.peptides –2016– № 78– P.17–23.
44. 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, №3. –P. 211–220.
45. Skarnes, R. C. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids./ Skarnes, R. C., Watson, D. W. // Bacteriol. Rev. – 1957–№21–P 273–294
46. Tautz, J. The buzz about bees/ Heidelberg: Springer –2008. – P. 284–300.
47. Thomas a. Jennings. Lyophilization Introduction. by Informa Healthcare USA, Inc.(original copyright 1999 by CRC Press) –2008.
48. Tossi A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides./ Tossi A, Sandri L, Giangaspero A // Biopolymers –2000–№55–P. 4–30.

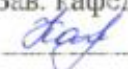
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

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

Задание

По ВКР студента Угаровой Юлии Андреевны

Тема работы: «Изучение физико-химических свойств
иммуностимулирующего фактора из меда».

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 2016 г. № 1191а/0

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

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения, глав обзора литературы («Иммунодефицитные состояния и иммуностимулирующие препараты»; «Иммунодефициты второго типа, их классификация, причины возникновения, показания к проведению иммуностимулирующей терапии»; «История изучения иммуностимуляторов, их классификация, самые распространенные препараты»; «Современные иммуностимулирующие препараты пептидной природы, применяемые в медицине» «Регуляция иммунной системы посредством антимикробных пептидов»; «Механизмы действия антимикробных пептидов»; «Иммуномодулирующая способность антимикробных пептидов»; «Антимикробные пептиды пчелиного происхождения»; «Механизмы социального и индивидуального иммунитета пчел <i>Apis Mellifera</i> »; «Апидаецин, как основной антибактериальный пептид пчел»; «Абаецин-сходства и отличия от апидаецинов»)	ноябрь - декабрь 2016	Выполнено
2	Ультрафильтрация Отработка метода Лоури и реакции Селиванова	декабрь-январь 2017	Выполнено
3	Ионообменная хроматография Лиофилизация	январь-февраль 2017	Выполнено
4	Высокоэффективная жидкостная хроматография	февраль-март 2017	Выполнено
5	Тест на иммуотропность	март-апрель 2017	Выполнено
6	Статистическая обработка результатов исследования, анализ полученных данных	апрель-май 2017	Выполнено
7	Написание глав «Материалы методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение»		

Дата выдачи задания «1» ноября 2016 г.

Руководитель

 М.Т. Геншин

Задание принял к исполнению

