МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ 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
Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ ИЗ МЁДА И ПЕРГИ»

Студент _____ Тугучев Михаил Вячеславович

Руководитель _____ Карпова Г. А.

Рецензент _____ Невитов М.Н.

Нормоконтролер _____ Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 15.06.2021 № 14)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 23.06.21 № 1)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ....4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ....7

1.1 Усреднённый состав и происхождение пчелиного мёда....7

1.2 Изменение состава пчелиного мёда в процессе хранения....9

1.3 Биологическая активностью компонентов пчелиного мёда....11

1.3.1 Антиоксидантная и противовоспалительная активность....11

1.3.2 Антибактериальная и ранозаживляющая активность....13

1.4 Усреднённый состав и происхождение перги....14

1.5 Биологическая активностью компонентов перги....17

1.5.1 Антиоксидантная и противовоспалительная активность перги....18

1.5.2 Антибактериальная активность перги....19

1.6 Биологически активные пептиды и их роль в организме....19

1.6.1 Биологически активные пептиды пчёл, пчелиного мёда и перги..20

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ....23

2.1 Материалы исследования....23

2.2 Методы исследований....23

2.2.1 Ультрафильтрация....23

2.2.2 Ионообменная хроматография....25

2.2.3 Обращённофазная твердофазная экстракция....27

2.2.4 Обращённофазная высокоэффективная хроматография....28

2.2.5 Осаждение белков трихлоруксусной кислотой....30

2.2.6 Определение концентрации фруктозы реакцией Селиванова....30

2.2.7 Определение концентрации белка методом Лоури....31

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ....32

3.1 Построение калибровочных прямых по белку и фруктозе....32

3.2 Ионообменная хроматография....33

3.2.1 Ход разделения и результаты....33

3.2.2 Ионообменная хроматография разбавленных растворов перги и мёда....36

3.2.3 Катионообменная хроматография.....38
3.3 Осаждение белков трихлоруксусной кислотой.....40
3.4 Результаты твердофазной экстракции пептидов.....42
3.5 Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография....46
3.6 Сравнение методов выделения и очистки пептидов.....49
ВЫВОДЫ.....51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....52

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время становится актуальной задача поиска новых групп терапевтических препаратов, обеспечивающих сильный терапевтический ответ при минимальных побочных явлениях и противопоказаниях. В связи с этим перспективным становится исследование различных веществ биологического происхождения, состав которых совершенствовался миллионами лет эволюции.

На фоне различных продуктов животного и растительного происхождения в качестве лекарственных средств в народной медицине выгодно выделяются продукты пчеловодства. Пчелиный мёд, маточное молочко, перга, трутневый расплод широко используются из–за своих полезных свойств, высокой питательной ценности [2, 55].

Прогресс в области биохимии и методов исследования биологической активности показал нам, что существует целый класс соединений, обладающих мощным регуляторным и стимулирующим потенциалом — биологически активные пептиды, поэтому сейчас актуальна задача поиска и характеристики новых пептидов, обладающих антимикробной, регуляторной или какой–либо ещё биологической активностью. Например, антимикробные пептиды видятся перспективной заменой антибиотикам, т. к. не вызывают антибиотикоустойчивости, в терапевтических концентрациях не оказывают токсического действия на системы организма, могут модулировать иммунный ответ [28].

Перспективными в отношении поиска новых биологически активных пептидов выглядят продукты пчеловодства — мёд и перга, издавна использовавшиеся в народной медицине как средства против многих заболеваний. За последние 50 лет было открыто, что мёд и перга имеют антибактериальное, противовоспалительное и антиоксидантное действие, обусловленное содержащимися в них различными веществами как

растительного, так и пчелиного происхождения.

Выделение отдельных биологически активных пептидов пчелиного мёда и перги позволит не только охарактеризовать эти пептиды с фундаментальной точки зрения, но и потенциально позволит создать на их основе разнообразные препараты, обладающие антибактериальным, ранозаживляющим, иммуностимулирующим действием. Выделение и характеристика биологически активных пептидов из пчелиного мёда и перги послужит мощным толчком для развития изучения других пчелопродуктов — маточного молочка, трутневого расплода, обножки, подмора и т. д., тоже обладающих определённой биологической активностью [3, 14, 53, 61].

Разработка оптимального метода выделения и очистки пептидной фракции пчелиного мёда и перги для дальнейшего изучения их биологической активности совершенно необходима, т. к. пчелиный мёд и перга относятся к многокомпонентным системам, и изучение биологической активности отдельных фракций невозможна без сколько–нибудь приемлемой степени очистки исследуемых молекул. Недопустимо исследовать биологическую активность тех или иных пептидов в смеси с углеводами, фенольными соединениями, витаминами и другими компонентами мёда или перги, т. к. будет невозможно точно указать на то, благодаря какому компоненту наблюдается тот или иной биологический эффект. Например, анаболическое действие мёда может проявляться как вследствие регуляторного действия пептидов, входящих в его состав, так и вследствие большой концентрации углеводов, несущих чисто энергетическую функцию.

Цель работы: разработать оптимальный метод выделения и очистки пептидной фракции пчелиного мёда и перги для дальнейшего изучения биологической активности пептидов этих пчелопродуктов.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Провести анализ литературы по теме исследования.
2. Исследовать и выбрать оптимальный способ выделения и очистки пептидной фракции пчелиного мёда.

3. Исследовать и выбрать оптимальный способ выделения и очистки пептидной фракции перги.
4. Сравнить исследованные методы выделения и очистки пептидных фракций мёда и перги.

Магистерская диссертация написана на 60 листах, содержит 23 рисунка, 6 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 81 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Усреднённый состав и происхождение пчелиного мёда

Пчелиный мёд является многокомпонентной биологической матрицей переменного состава, что значительно затрудняет исследование биологической активности его компонентов из–за большого разнообразия молекул, входящих в состав пчелиного мёда, что усложняет процесс выделения целевых молекул. Состав мёда имеет значительную вариабельность по целому ряду показателей, таких как концентрация моно–, ди– и полисахаридов, содержание фенольных веществ, количество белка и свободных аминокислот, и зависит от ботанического состава медоносов, произрастающих в районе сбора пыльцы и нектара, породы пчёл, климатических и погодных условий и т. д., однако усреднённые показатели, представленные в Таблице 1, позволяют дать примерное представление о веществах, обуславливающих биологическую активность пчелиного мёда. Всего в пчелином мёде обнаружено около 300 различных компонентов, треть из которых являются обязательными и присутствуют в каждом сорте мёда [5, 22, 63].

В составе пчелиного мёда можно выделить как таковых две большие группы веществ: растительного и пчелиного происхождения. Вещества растительного происхождения попали в мёд из исходного продукта — цветочного нектара. К ним относятся углеводы, макро– и микроэлементы, витамины, органические кислоты, фенольные соединения, пигменты. К веществам пчелиного происхождения относится подавляющая часть азотистых соединений мёда: белки, пептиды, аминокислоты. Белки понижают поверхностное натяжение меда, усиливают его вспенивание, содействуют сохранению мелких воздушных пузырьков, осложняющих обработку и ухудшающих его внешний вид за счет опалесценции. Хорошо известна склонность гречишного меда к вспениванию, что обусловлено

высоким содержанием белка. Белковые вещества находятся в меде в коллоидном состоянии, вызывают помутнение и потемнение при нагревании, а также являются центрами кристаллизации сахаров. К другим азотистым соединениям относятся свободные аминокислоты [53, 80].

Таблица 1 — Усреднённый состав пчелиного мёда

Показатель	Значение	Показатель	Значение
Вода, %	19	Фруктоза, %	75
Глюкоза, %	35	Сахароза, %	2,2
Восстанавливающие дисахариды, %	6,6	Высшие сахара, %	2,1
Белки, %	0,3	Кремний, мг/кг	136
Рибофлавин, мг/кг	9	Кальций, мг/кг	107
Магний, мг/кг	40	Натрий, мг/кг	251
Калий, мг/кг	441	Марганец+медь, мг/кг	0,8
Хром, мг/кг	0,3	Цинк, мг/кг	3
Фосфор, мг/кг	129	Тиамин, мг/кг	0,05
Алюминий+железо, мг/кг	0,6	Пантотеновая кислота, мг/кг	1,05
Пиридоксин, мг/кг	0,01	Аскорбиновая кислота, мг/кг	60
Фолиевая кислота, мг/кг	0,03	Никотиновая кислота, мг/кг	1,10

Не смотря на то, что исходным продуктом, из которого производится пчелиный мёд, является цветочный нектар цветковых растений, конечный продукт сильно отличается по химическому составу от нектара. Причиной этого являются различные превращения, которые претерпевает цветочный нектар во время ферментации и обработки пчелой во время производства пчелиного мёда. Собрав нектар хоботком из нектарника, рабочая пчела помещает его в медовый желудочек. Долю нектара пчела использует для собственного питания, остальное несет в улей и передает его пчеле–

приемщице. Пчела–приемщица многократно (120–240 раз) выпускает капельку нектара на хоботок и снова заглатывает её, при этом значительная часть воды, содержащейся в нектаре, испаряется. После этого пчела помещает капельку нектара в свободную ячейку сот, а другие пчелы переносят ее много раз из одной ячейки в другую [1]. Испарение воды продолжается, нектар густеет и превращается в пчелиный мёд; дополнительно за время нахождения нектара в желудочке пчелы часть воды всасывается пчелой через стенку желудочка. Также в организме пчелы нектар подвергается действию ферментов, содержащихся в слюне пчелы. В основном эти ферменты представлены инвертазой, альфа– и бета–амилазами, кислой и щелочной фосфатазой, каталазой, пероксидазой, полифенолоксидазой, глюкооксидазой, липазой, редуктазой, протеазами, аскорбинатоксидазой, фосфолипазой. Наиболее изучены амилолитические ферменты меда — альфа– и бета–амилазы. Их суммарную активность выражают диастазным числом, которое принято измерять в единицах Готе, используемое как рутинный метод определения качества пчелиного мёда [15, 20].

1.2 Изменение состава пчелиного мёда в процессе хранения

В процессе хранения мед претерпевает ряд изменений. Сначала он густеет, потом мутнеет и, наконец, вследствие кристаллизации глюкозы превращается в плотную массу. Изменения, происходящие при образовании меда, еще недостаточно изучены. Основные процессы, протекающие при этом — разложение сахарозы на глюкозу и фруктозу под действием инвертазы и испарения воды. Наряду с разложением происходит синтез многих сахаров, например, если в нектаре содержится 3–4 вида сахаров, то в меде их около 25. Увеличение концентрации минеральных и органических кислот и зольных элементов в результате испарения влаги приводит к формированию определенной буферной системы меда [19, 35, 45].

Мед, выделенный в пунктах откачки из сотов, разливают для транспортирования в металлические молочные бидоны или специальные фляги, изготовленные из алюминия [9]. Однако для длительного хранения эти фляги использовать нельзя, так как кислоты меда взаимодействуют с металлом и происходит частичное растворение его в меде, а также потемнение за счет продуктов разрушения сахаров, катализируемых металлом. Во флягах, изготовленных из нержавеющей стали, мед может транспортироваться и храниться длительное время без ухудшения качества.

Во время хранения в меде продолжаются ферментативные процессы стабилизации состава сахаров, происходит дальнейшее разложение сахаров до более простых веществ, накопление летучих соединений, придающих меду его специфический медовый аромат. При низких температурах происходит кристаллизация глюкозы, мелецитозы. Рассмотрим процессы, происходящие в меде при хранении, на примерах отдельных групп веществ.

В процессе хранения меда в герметичной таре происходит уменьшение содержания свободной воды. За первые десять дней хранения содержание свободной воды уменьшается на 0,6–1,0% и за вторую декаду еще на 0,6–0,8%. При кристаллизации глюкозы связывается часть свободной воды, что приводит к ее уменьшению за счет образования кристаллогидратов. При дальнейшем хранении меда в герметичной таре содержание свободной воды существенно не изменяется [54, 67, 77].

Во время хранения меда в негерметичной и закрытой полиэтиленовыми крышками таре содержание свободной воды увеличивается за счет сорбции воды поверхностными слоями. При хранении меда, упакованного в стеклянную тару и закрытую полиэтиленовыми крышками, при комнатной температуре в течение первого года увеличивается содержание свободной воды на 0,5–0,9%, а в течение второго года — еще на 0,3%. Это необходимо учитывать при хранении меда на складах и хранилищах.

На скорость кристаллизации меда влияет ряд факторов: растения, с которых собирают нектар, температура воздуха в течение суток в период

откачки меда, время заполнения и запечатывания емкости (часы), время нахождения емкости с медом в помещении временного хранения (суток), колебание температуры в течение дня и ночи в помещении временного хранения емкостей с медом, температура в помещении постоянного хранения емкостей с медом. На скорость кристаллизации глюкозы также оказывают влияние белковые и слизистые вещества, являющиеся центрами кристаллизации. Однако сильнее всего на количестве и размерах кристаллов сказывается присутствие пыльцевых зерен растений. Чем больше этих зерен, тем соответственно больше центров кристаллизации и меньше размеры самих кристаллов. Мед, пропущенный через фильтры из песка или специальных сортов глины, длительное время не кристаллизуется, так как не имеет белковых, слизистых веществ и пыльцевых зерен [75].

1.3 Биологическая активностью компонентов пчелиного мёда

Не смотря на большую историю применения пчелиного мёда в терапевтических целях, мёд остаётся лекарственным средством только в области народной медицины. Различные исследования биологической активности компонентов мёда указывают на то, что он обладает антиоксидантной, антимикробной, ранозаживляющей, метаболитической активностью, ассоциируемыми с различными компонентами мёда.

1.3.1 Антиоксидантная и противовоспалительная активность

Литературные данные о составе и биологической активность мёда свидетельствуют о том, что в мёде содержится ряд соединений, проявляющих антиоксидантную активность: аскорбиновая кислота полифенольные и фенольные соединения (флавоноиды) [4, 21, 29, 64]. Если аскорбиновая кислота является неотъемлемым компонентом мёда, то состав мёда по фенольным соединениям сильно различается в зависимости от его ботанического происхождения. Например, кемпферол обнаруживается в

розмариновом мёде, а квертецин в подсолнечниковом, что свидетельствует о том, что полифенольные и фенольные соединения в составе пчелиного мёда являются веществами растительного происхождения [70].

Антикосидантная активность мёда, так же как и состав, сильно варьирует в зависимости от ботанического и географического происхождения, породы пчелы и погодно–климатических условий. Антиоксидантная активность мёда связывается в основном со следующими фенольными соединениями: апигенин, акацетин, галангин, кемпферол, квертицин, пиноцембрин, хризин, фисетин, фенэтиловый эфир кофеиновой кислоты [36, 40, 81]. Экспериментально установлено, что смесь распространённых флавоноидов, выделенных из мёда, оказывает протекторное действие на мембраны эритроцитов в условиях оксидативного стресса. т. е. предотвращает перекисное окисление липидов компонентов мембраны за счёт возможности встраивания этих молекул в билипидный слой и обезвреживания свободных радикалов типа суперокисдов и гидроксилов путём донорства электронов или протонов, хелатирования ионов металлов [6, 10, 23]. Существуют также данные, что перечисленные биофенолы могут ингибировать работу ферментов, запускающих цепные реакции образования свободных радикалов, что также ведёт к снижению интенсивности перекисного окисления липидов [8, 16].

На антиоксидантную активность мёда оказывает влияние не только концентрация и состав фенольных соединений, но и их молекулярное окружение. Установлено, что при наличии в составе мёда органических кислот, таких как лимонная, яблочная и глюконовая, последние действуют как хелатирующие агенты, усиливая действие не только фенольных соединения, но и повышая активность каталазы и глюкозооксидазы, элиминирующих активные формы кислорода, предотвращая тем самым образование свободных радикалов [24].

С наличием в составе фенольных соединений связывают также и противовоспалительную активность мёда. Показано, что галангин

ингибирует циклооксигеназу-1 и уменьшает экспрессию индуцибельной формы циклооксигеназы-2, фенилэтильный эфир кофеиновой кислоты ингибирует миграцию арахидоновой кислоты из клеточных мембран, что вызывает супрессию обеих форм ЦОГ, а хризин, наряду с ингибированием индуцибельной формы ЦОГ-2, ингибирует индуцибельную NO-синтазу, что тоже снижает продукцию провоспалительных молекул [38, 46, 59].

1.3.2 Антибактериальная и ранозаживляющая активность

В целом ряде исследований показано, что пчелиный мёд обладает антибактериальной и ранозаживляющей активностью, которую чаще всего связывают с тремя факторами: наличие активных форм кислорода, высокая концентрация углеводов, кислый pH. Наиболее исследованным в отношении антибактериальной и ранозаживляющей активности является мёд мануки, в силу своего ботанического происхождения имеющий высокую концентрацию перекиси водорода, оказывающую бактерицидное действие. С использованием очищенного и стерилизованного мёда медицинского качества производится ранозаживляющий гель Revamil, а также специальные патчи, накладываемые на места повреждения кожи [11].

Большую роль в антибактериальной и ранозаживляющей активности мёда играет высокая концентрация углеводов, создающая высокое осмотическое давление, что препятствует размножению патогенов, т. е. оказывает бактериостатическое действие, и кислый pH мёда, обусловленный присутствием органических и небольшого количества неорганических кислот. В серии различных экспериментальных работ показана антибактериальная активность растворов пчелиного мёда против *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, P. Aeruginosa, Clostridium botulinum* [7, 12, 43, 69, 76].

Однако в последние несколько десятилетий находятся новые факторы антибактериальные факторы в составе пчелиного мёда — антимикробные пептиды пчелиного происхождения, оказывающиеся в мёде как продукты

секреции слюнных желёз при переработке нектара в мёд. Антимикробные пептиды (АМП) — короткие молекулы пептидов, которые синтезируются в ответ на появление в организме чужеродных бактерий, грибков или вирусов. АМП являются мощным оружием организма в борьбе против различных патогенных факторов; у человека различные виды этих пептидов синтезируются практически всеми клетками системы врождённого иммунитета (фагоциты, лейкоциты, нейтрофилы, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, клетки эпителия). Большая часть открытых на сегодняшний момент антимикробных пептидов по своему суммарному заряду являются катионными молекулами. Их положительный заряд объясняет способность электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными мембранами бактериальных патогенов, действие же анионных АМП основано на специфическом взаимодействии с внутриклеточными мишенями и ингибирование метаболических процессов бактерий [48, 57, 78].

1.4 Усреднённый состав и происхождение перги

Перга — приготовленная пчёлами смесь из цветочной пыльцы, образуемых железами насекомых ферментов и мёда, запечатанная в соты и подвергнутая молочнокислому брожению. Пыльцу, приносимую в улей в виде обножек, пчелы складывают в ячейки сотов и уплотняют её, утрамбовывая своими головками; каждую ячейку заполняют не более чем на 2/3 её глубины, а сверху заливают пыльцу слоем мёда, закрывая затем «крышкой» из воска и прополиса. Сложенная таким образом пыльца называется пергой. Функционально перга представляет собой белковый корм для пчёл, что отражено в её составе (Таблица 2.) и высокой энергетической ценности (около 400 ккал/100 г. перги) [13, 17].

По лекарственным свойствам перга стоит в одном ряду с пчелиным мёдом, прополисом и маточным молочком. Благодаря противомикробному и антибактериальному действию молочной кислоты, выделяемой при

расщеплении углеводов, перга является абсолютно чистым продуктом. Ею питаются весной проснувшиеся и проголодавшиеся пчёлы, когда ещё не цветут сады и поля. Энергетическая ценность перги в три раза больше, чем пыльцы, что позволяет насекомым хорошо насытиться после зимней спячки.

Таблица 2 — Усреднённый состав перги

Показатель	Значение	Показатель	Значение
Вода, %	6,05	Каротиноиды, мкг/100 г.	66,5
Жиры, г/100 г.	1,9	Белки, г/100 г.	20
Углеводы, г/100 г.	74,82	Фруктоза, г/100 г.	11,8
Трегалоза, г/100 г.	0,92	Общее количество свободных углеводов, г/100 г.	18
Щавелевая кислота, г/100 г.	0,38	Кальций, мкг/100 г.	198
Железо, мкг/100 г.	27,3	Калий, мкг/100 г.	338
Магний, мкг/100 г.	61	Натрий, мкг/100 г.	14,2
Цинк, мкг/100 г.	3,31	Фосфор, мкг/100 г.	251
Марганец, мкг/100 г.	2,6	Медь, мкг/100 г.	700

Кроме указанных в Таблице 2 соединений в перге присутствует большое количество свободных аминокислот, витаминов и др. веществ, имеющих растительное происхождение:

- 16 свободных аминокислот:
  - глутаминовая кислота (24,3 г/кг);
  - аспарагиновая кислота (29,92 г/кг);
  - лейцин (18,70 г/кг);
  - аланин (12,69 г/кг);
  - валин (13,49 г/кг);
  - серин (13,31г/кг);
  - гистидин (12,21 г/кг);
  - фенилаланин (11,41 г/кг);

◦ глицин (11,13 г/кг);
◦ тирозин (12,98 г/кг);
◦ треонин (11,49 г/кг);
◦ изолейцин (10,59 г/кг);
◦ пролин (9,04 г/кг);
◦ аргинин (6,61 г/кг);
◦ лизин (3.89 г/кг);
◦ метионин (2,02 г/кг).
• 13 жирных кислот:
◦ линолевая (8,11 г/кг);
◦ линоленовая (28,96 г/кг);
◦ миристолеиноавя (15,1 г/кг);
◦ миристиноавя (0,41 г/кг);
◦ олеиновая (5,14 г/кг);
◦ пальмитиновая (35,92 г/кг);
◦ пальмитолеиновая (14,36 г/кг);
◦ арахидоновая (4,08 г/кг);
◦ эруковая (1,97 г/кг);
◦ купинодоновая (3,17 г/кг);
◦ гадолеиновая (0,47 г/кг);
◦ стеариновая (0,93 г/кг);
◦ лауриновая (0,27 г/кг);
• витамины:
◦ C (152–649 мг/кг);
◦ B1 (5,6–10,8 мг/кг);
◦ B2, B3 (16–51 мг/кг);
◦ B6, B7 (0,2 мг/кг);
◦ B9 (3,4–6,8 мг/кг);
◦ PP (87,9–210 мг/кг);
◦ E (6,3–19,2 мг/кг);
◦ D (0,2–0,6 мг/кг);

• органические кислоты;

• ферменты и гормоноподобные вещества;

• фенольные соединения [30, 65, 73].

Так же, как и пчелиный мёд, перга приобретает отличный от пыльцы состав за счёт различных процессов, происходящих с ней в течение выработки пчелой. Во–первых, добавление мёда в соты при консервации перги значительно повышает количество углеводов в составе перги, и в основном это фруктоза и глюкоза. Сравнительная характеристика состава перги и пыльцы показывает также изменения и за время брожения, и в зависимости от сезона сбора пыльцы и консервации перги. В связи с этим различают так называемую «весеннюю» и «летнюю», относительно схожих по составу, но отличающихся, например, содержанием витаминов (в большую сторону в «летней» перге в отношении витаминов группы В и С, каротиноидов), углеводов (в «весенней» больше глюкозы). Большое влияние на конечный состав перги оказывает состав исходного сырья, из которого она была произведена — пыльцы (обножки), т. е. состав перги зависит от её ботанического происхождения [32].

Спектр биологически активных пептидов перги остаётся не до конца изученным, поэтому изучение их биологических свойств является на данный момент актуальным направлением.

1.5 Биологическая активностью компонентов перги

Перга, как и пчелиный мёд, с давних времён используется в народной медицине как средство против простуды, заболеваний органов пищеварения и кожи, и зачастую используется в смеси с мёдом. Наряду с питательной ценностью большое значение перги как терапевтического препарат обуславливают содержащиеся в ней полифенольные соединения и органические кислоты. Экспериментально установлено, что в перге находятся квертецин и его гликозиды, нарингенин, кемпферол, изорамнетин, рутин, галангин, хризин, пиноцембрин, гербацетин, мирицетин, трицетин,

лютеолин, катехин, эпикатехин, апигенин [26].

1.5.1 Антиоксидантная и противовоспалительная активность перги

В целом ряде исследований, целью которых было изучить антиоксидантную активнось перги, были получены различающиеся, но свидетельствующие о наличии таковой активности у исследуемых образов. Полная антиоксидантная активность перги, как и в случае с пчелиным мёдом, связывается с содержанием в исследуемых образцах полифенольных и фенольных соединений растительного происхождения, а также с наличием органических кислот [34].

Антиоксидантная активность перги изучалась против таких прооксидантных агентов, как четырёххлористый углерод, афлатоксин, тебуканазол. Во всех исследованиях животные из опытных групп показывали меньший уровень маркеров оксидативного стресса, что свидетельствует об антиоксидантной активности перги.

Некоторую роль в антиоксидантной активности перги играет также и наличие в её составе ферментов, выделяемых вместе со слюной железами пчелы: каталазы, глюкозооксидазы [44].

В целом механизм антиоксидантного действия соединений перги такой же, как и соединений пчелиного мёда: полифенольные и фенольные соединения, а также органические кислоты, оказывают хелатирующее действие, активируют антиоксидантные ферменты, являются субстратами для реакций взаимодействия и обезвреживания активных форм кислорода и других свободных радикалов, оказывающих негативное влияние на липидные компоненты клеточных мембран [66].

Противовспалительная активность перги также связывается с её фенольным и полифенольным составом. Во–первых, при местном применении препаратов из перги фенольные соединения могут вступать в прямой контакт с иммунокомпетентными клетками и оказывать биологическую активность. Например, показано, что квертецин ингибирует метаболизм арахидоновой кислоты, что приводит к уменьшению степени

воспаления, и как следствие, уменьшению местной воспалительной реакции и инфильтрации нейтрофилов к очагу воспаления; жирные кислоты и фитостеролы тоже уменьшают степень воспаления за счёт ингибирования работы обеих форм циклооксигеназы. Во–вторых, фенольные соединения перги (анетол) является потенциальным ингибитором активации воспаления по пути NF-κB [52, 68, 79].

1.5.2 Антибактериальная активность перги

В целом ряде исследований отмечается антибактериальная активность перги против таких патогенов, как *Staphylococcus aureus, Candida glabrata, Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Klebsiella sp.* Было установлено, что антибактериальный эффект зависит от концентрации исследуемого водного или этанольного раствора и определяется в большей степени присутствием в перге фенольных соединений, флавоноидов и глюкозооксидазы, что связывается с деградацией клеточной мембраны патогена и дальнейшим разрушением бактериальной клетки, т. .е оказывается бактерицидное действие [25, 47, 60].

1.6 Биологически активные пептиды и их роль в организме

Биологически активные пептиды являются мощным регуляторным компонентом нейрогуморальной регуляции человека. С помощью коротких белковых сигнальных молекул происходит управление практически всеми системами организма, обеспечивается поддержание гомеостаза на уровне регуляции артериального давления, водно–солевого баланса, иммунной системы, а также управление поведением и другими жизненными процессами в мозге через обмен различными нейропептидами между нейронами тех или иных функциональных групп [33, 49, 72].

Биологически активные пептиды широко распространены не только среди млекопитающих, но и среди всех групп живых организмов. Количество

исследованных пептидов, выделенных из того или иного природного источника, за последнее время значительно возросло, что связано, во–первых, с появившимся интересом исследователей к перспективной теме, во–вторых, с прогрессом аналитических и препаративных методов биохимии, а также биоинформатики, что позволяет открывать пептиды не только классическими методами биохимии, но также и «скрытые» пептиды, являющиеся продуктами экспрессии генов, но появляющиеся в клетке в малых количествах или вовсе не накапливающихся в каких–либо количествах, т. е. подвергающихся метаболизму сразу после оказания биологического эффекта [18, 74].

Изучение биологической активности экзогенных пептидов сопряжено с рядом трудностей. Во–первых, зачастую целевые пептиды находятся во многокомпонентных биологических матрицах, что делает очень сложным выделение нужных молекул в приемлемых количествах и с нужной степенью чистоты. Секвенирование аминокислотной последовательности нужного пептида и последующий его синтез для дальнейшего изучения его биологической активности является трудозатратным и дорогостоящим процессом [39, 50]. Во–вторых, проблемой является путь введения изучаемого пептида или смеси пептидов в модельные макроорганизмы. Пероральное введение сопряжено с действием специфических и не специфических протеолитических ферментов ЖКТ, что приводит к потере биологической активности; внутривенное введение грозит тяжёлыми токсическими последствиями вследствие неправильно подобранной дозировки или самой природы пептида [42, 62].

1.6.1 Биологически активные пептиды пчёл, пчелиного мёда и перги

Медоносная пчела *Apis mellifera*, как представитель семейства *Apidae*, синтезирует целый ряд открытых биологически активных пептидов, исследовательскую ценность среди которых представляют антимикробные пептиды, являющиеся компонентами системы врождённого иммунитета этих насекомых (Таблица 3) [58].

Таблица 3 — Антимикробные пептиды медоносной пчелы

Пептид	Аминокислотная последовательность
Абаецин	YVPLPNVPQPGRRPFPTFPGQGPFNPKIKWPQGY
Апидаецин IA	GNNRPVYIPQPRPPHPRI
Апидаецин IB	GNNRPVYIPQPRPPHPRL
Мелиттин	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
Роялизин	VTCDLLSFKGQVNDSACAANCLSLGKAGGHCEKVGCIC RKTSFKDLWDKRF
Апидаецин II	GNNRPIYIPQPRPPHPRL
Джелеин I	PFKLSLHL
Джелеин II	TPFKLSLHL
Джелеин III	EPFKLSLHL
Гименоптаецин	EFRGSIVIQGTKEGKSRPSLDIDYKQRVYDKNGMTGDAY GGLNIRPGQPSRQHAGFEFGKEYKNGFIKGQSEVQRGPG GRLSPYFGINGGFRF
Мастопаран-X	INWKGIAAMAKKLL
Дефензин 1	YPLDQVEEQDEHQVAHIRVRRVTCDLLSAEAKGVKVNH AACAAHCLLKRKRGGYCNKRRICVCRN

Антимикробные пептиды медоносной пчелы находятся как в гемолимфе, так и являются компонентами пчелиного яда, т. е. играют защитную функцию не только за счёт осуществления и модуляции иммунного ответа против бактериальных, вирусных или грибковых патогенов, но и оказывают цитотоксическое действие на многоклеточные организмы [31, 56].

Можно предположить, что если антимикробные пептиды играют существенную роль в обеспечении защитных реакций организма пчелы, то они будут секретироваться не только в гемолимфу и пчелиный яд, но также и в слюну (по аналогии с иммуноглобулинами млекопитающих), т. е. их можно будет найти и в пчелином мёде, и в перге — продуктах, которые непосредственно подвергаются воздействию секрета пчелиных слюнных

желёз.

Действительно, в мёде были идентифицированы такие белки гемолимфы медоносной пчелы, как апальбумин 1 (технически не являющийся пептидом) и дефензин 1 — классический антимикробный пептид. Предполагается, что антимикробные пептиды в составе пчелиного мёда являются антибактериальными факторами, предотвращающими порчу продукта во время его хранения, т. е. не только обеспечивают сохранность кормовой базы пчёл в периоды недостатка или отсутствия нектара, но и являются факторами коллективного иммунитета наравне с использованием прополиса для изоляции улья от внешней среды или коллективной лихорадки для повышения температуры внутри улья. Антибактериальные пептиды в мёде имеют, несомненно, пчелиное происхождение и попадают туда через слюну, поэтому поиск других антимикробных пептидов в мёде и других пчелопродуктах является перспективным направлением исследований в области биохимии пчелопродуктов [51].

Однако поиск новых пептидных компонентов, например, пчелиного мёда и перги, сопряжён с рядом трудностей. Как уже отмечалось выше, перга и мёд относятся ко многокомпонентным системам, что существенно затрудняет выделение и очистку биологически активных пептидов из этих субстанций. Существующие исследования используют в качестве методов выделения и/или количественного определения того или иного биологически активного пептида избирательные методы наподобие аффинной хроматографии или иммуноферментного анализа, т. е. ставится цель найти конкретный, заранее известный компонент, а не выделить новый и охарактеризовать его с нуля. В связи с этим становится актуальной проблема поиска новых комбинаций методов для выделения пептидов из продуктов пчеловодства с целью дальнейшего изучения их биологической активности [71].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Материалом для исследования являлись пчелиный мёд и перга.

Для приготовления 30%-го водного раствора мёда на аналитических весах взвешивали навеску массой 60 гр и растворяли в 200 мл дистиллированной воды, после чего фильтровали через ватный фильтр на воронке для удаления крупных загрязнений и через фильтр марки «красная лента» на воронке Бюхнера под вакуумом для удаления более мелких примесей. Полученный раствор хранился в морозильной камере при температуре -36° С.

Для приготовления 20%-го водного раствора пчелиной перги взвешивали навеску освобождённой от сот перги массой 40 гр и растворяли в 200 мл дистиллированной воды. Для разрушения пыльцевых зёрен полученный раствор подвергли нескольким циклам замораживания и оттаивания, после чего центрифугировали в течение 20 мин на скорость 10000 об/мин для осаждения крупных обломков и загрязнений, осадок отбрасывали, а супернатант фильтровали под вакуумом на воронке Бюхнера через фильтр марки «красная лента». Полученный раствор хранился в морозильной камере при температуре -36° С.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Ультрафильтрация

Метод ультрафильтрации является эффективной заменой диализа для сепарации молекул, очистки раствора или замены буферных растворов. Принцип метода заключается в циклическом пропускании фильтруемого раствора через полупроницаемую мембрану, пропускающую только молекулы с определённой молекулярной массой; не прошедшие через

мембрану молекулы с током жидкости возвращаются обратно в исходный резервуар. Таким образом происходит не только разделение молекул по молекулярной массе, но и концентрирование определённой группы молекул.

Ультрафильтрацию производили на установке, состоящей из перистальтического насоса MasterFlex L/S и мембран Vivaflow 200 с порогом молекулярной массы 5 и 10 кДа.

Перед началом работы с мембраной необходимо провести цикл очистки для удаления возможных загрязнений и предотвращения контаминации исследуемых растворов. Для этого в резервуар с исходным раствором заливали и пропускали через мембрану последовательно дистиллированную воду, 0,5 М раствор NaOH для омыления загрязнений и снова дистиллированную воду для очистки системы от оставшегося раствора щёлочи.

После необходимых приготовлений в резервуар с исходным раствором заливался необходимый объём разделяемого раствора мёда и перги. Разделение происходило по следующей схеме:

1. Сначала фильтрация производилась через мембрану с порогом молекулярной массы 10 кДа для отделения белков от пептидов.
2. Затем фильтрат, содержащий пептиды и молекулы с массой менее 10 кДа пропускался через мембрану с порогом молекулярной массы 5 кДа.

Таким образом уже на этапе фильтрации решалось несколько задач:

1. Сепарация молекул на основе их молекулярной массы.
2. Частичная очистка растворов, содержащих молекулы с массой от 5 до 10 кДа, от углеводов и других низкомолекулярных примесей.

Фильтрация на всех этапах велась под давлением, не превышающим 3 бара, объём в резервуаре с исходным раствором мониторился с целью недопущения прогона пузырей воздуха через мембрану.

В итоге после ультрафильтрации было получено 6 растворов:

1. Раствор пчелиного мёда и перги, содержащий молекулы с массой выше 10 кДа — белки, полисахариды, макропримеси.

2. Раствор пчелиного мёда и перги, содержащий молекулы с массой менее 5 кДа — часть пептидов, углеводы, пигменты, ионы металлов, витамины, фенолы и т. д.
3. Раствор пчелиного мёда и перги, содержащий молекулы с массой в интервале от 5 до 10 кДа — пептиды, углеводы с меньшей концентрацией.

Для дальнейших исследований использовались два последних типа растворов.

2.2.2 Ионообменная хроматография

Принцип ионообменной хроматографии заключается в разделении веществ в зависимости от их заряда при тех или иных условиях. В качестве неподвижной фазы при различных типах ионообменной хроматографии используются ионообменники — специально модифицированные носители, имеющие на поверхности ионогенные группы — функциональные группы, могущие отдавать в подвижную фазу ионы. По способности отдавать ионы в подвижную фазу разделяют анионообменники и катионообменники: первые, ионизируясь, отдают в раствор анионы — отрицательно заряженные частицы, при этом сами заряжаясь положительно, вторые — катионы, положительно заряженные частицы, при этом сами заряжаясь отрицательно. Ионогенные группы химически «пришивают» на различные типы носителей. В биохимии чаще всего используют гели на основе химически сшитых в гранулы декстранов — сефадексы, микрокристаллическую целлюлозу, полимерные органические смолы, силикагель. В данном случае использовалась микрокристаллическая DEAE-целлюлоза и КМ-целлюлоза, т. е. разделение велось в режиме как анионообменной, так и катионообменной хроматографии.

Принцип разделения белковых молекул с помощью метода ионообменной хроматографии заключается в придании белковой молекуле определённого заряда с последующей её сорбцией на неподвижной фазе,

после чего заряд меняется на противоположный или молекула становится нейтральной и элюируется в другой фракции. Заряд белковой молекуле придаётся с помощью буферных растворов определённого pH и концентрации, т. к. белки и аминокислоты представляют собой цветтер-ионы — молекулы, несущие на себе две противоположно заряженные при диссоциации функциональные группы. Таким образом, белки суммарно становятся заряженные отрицательно при pH буферного раствора выше изоэлектрической точки белка pI.

Для использования в качестве ионообменника DEAE- и КМ-целлюлозу следует сначала должным образом подготовить — провести преформирование. Это позволит разрушить ненужные водородные связи между молекулами целлюлозы, которые образуются в результате хранения носителя в сухом виде и экранируют ионогенные группы, а также переведёт их в нужную форму (в случае DEAE-целлюлозы в OH—форму, в случае КМ-целлюлозы в H-форму). Для преформирования взвешивают навеску сухой целлюлозы массой 2 гр и заливают дистиллированной водой для набухания на несколько часов. Путём повторения нескольких циклов декантации и заполнения добиваются удаления крупных обломков носителя и потенциальных загрязнений, после чего лишний слой воды сливают и носитель заливают 15 объёмами 0,5 M HCl на 30 минут. Спустя обозначенное время ионообменник промывают дистиллированной водой до pH 4 (контроль вёлся по индикаторной бумаге) и заливают на 30 минут 0,5 M раствором NaOH для конечного перевода в OH—форму (только в случае с DEAE-целлюлозой).

Фракционирование растворов перги и мёда велось на колонке размером 6x1,5 см, заполненной DEAE-целлюлозой и уравновешенной начальным элюэнтом — 0,2 M ТРИС-HCl буферным раствором с pH = 10. После нанесения разделяемого раствора мёда или перги в объёме 500 мкл проводилась элюция начальным буферным раствором, объём собираемых фракций равнялся 1,5 мл, после чего буферный раствор менялся на конечный

— 0,2 М Na-цитратный буферный раствор с pH = 6. Полученные фракции использовались для дальнейшего анализа. В случае КМ-целлюлозы использовалась колонка размером 6x1,5 см, уравновешенная 0,2 М Na-цитратным буферным раствором, pH = 4, им же и велась начальная элюция, а десорбция закрепившихся молекул велась 0,2 М ТРИС-HCl, pH = 9.

2.2.3 Обращённофазная твердофазная экстракция

Принцип метода твердофазной экстракции состоит в различной способности молекул разделяемой смеси взаимодействовать и связываться с сорбентом — неподвижной фазой, в результате чего достигается эффективное разделение смеси веществ. Метод твердофазной экстракции относится к хроматографическим методам и характеризуется быстротой и простотой исполнения, экономичностью. В качестве сорбентов чаще всего используются химически модифицированные гранулированные силикогели, на поверхность которых пришиты различные функциональные группы. Взаимодействуя с функциональными группами гранул неподвижной фазы, молекулы разделямой смеси двигаются сквозь фронт сорбента под действием потока подвижной фазы с разной скоростью, вследствие чего достигается разделение смеси на отдельные компоненты. Твердофазная экстракция, в зависимости от типа носителя и элюента, бывает нормальнофазной и обращённофазной. В первом случае гранулы носителя модифицированы полярными функциональными группами, а в качестве подвижной фазы выступает неполярный органический растворитель, во втором случае носитель — неполярный, а подвижная фаза — в различной степени полярный растворитель. Молекулы разделяемых смесей имеют определённый параметр — logP, который характеризует, насколько близки будут скорости двух типов молекул при разделении их смеси в условиях одной системы твердофазной экстракции [27, 41].

Для обращённофазной твердофазной экстракции растворов мёда и перги использовались картриджи SPE C18 объёмом 1 мл. На этапе

подготовки картриджа проводилось его кондиционирование: промывка водным 70%-м раствором ацетонитрила с 0,1% фосфорной кислоты в количестве двух объёмов картриджа, затем наносился разделяемый раствор мёда или перги в объёме 1 мл и производилась начальная элюция 0,1%-м водным раствором фосфорной кислоты в количестве двух объемов картриджа. Финальная элюция производилась кондиционирующим раствором (водный 70%-м раствор ацетонитрила с 0,1% фосфорной кислоты) в объёме 1 мл со сбором элюции в отдельную фракцию.

2.2.4 Обращённофазная высокоэффективная хроматография

Обращённофазная высокоэффективная жидкостная хроматография является вариантом жидкостной колоночной хроматографии и основана на разделении смеси молекул под действием тока элюента — подвижной фазы, через неподвижную матрицу носителя — неподвижную фазу. В варианте обращённофазной хроматографии в качестве неподвижной фазы используется неполярный носитель — чаще всего гранулы силикагеля, химически модифицированные различными функциональными группами (C18, C8 и так далее), а в качестве подвижной фазы — полярный растворитель (водные или чистые растворы ацетонитрила, метанола и так далее). В качестве колонок для ВЭЖХ используют стальные, пластиковые или стеклянные трубки, ограниченные с обоих концов феррулами и плотно заполненные носителем — неподвижной фазой. В силу того, что гель, заполняющий колонку, упакован очень плотно, разделение идёт под большими значениями давления (порядка 10 МПа), что, с одной стороны, накладывает ограничения на подбор материалов для содержимого колонки, материала, из которого она изготовлена, а также других частей хроматографа, но с другой стороны позволяет проводить разделение смеси молекул с большой скоростью и эффективностью. Использование различных типов детекторов позволило методу ВЭЖХ занять одно из главенствующих положений среди остальных методов разделения биомолекул. Зачастую

применяются спектрофотометрические, люминесцентные, кондуктометрические детекторы, которые позволяют в реальном времени следить за показаниями элюции веществ с колонки. Подключение к хроматографу автоматического коллектора фракций позволяет полностью автоматизировать процесс разделения и очистки молекул.

Для анализа полученных после ультрафильтрации растворов перги и мёда использовалась хроматографическая система NGC Quest 10 Plus со спектрофотометрическим детектором, колонка SUPELCOSIL LC-18-T размерами 250x4,6 мм, размер частиц 5 мкм, коллектор фракций BioFrac.

ОФ-ВЭЖХ выполнялась в двух режимах: препаративном и аналитическом. Препаративный режим предполагает разделение смеси веществ в заведомо неразделяющих условиях для того, чтобы произвести очистку смеси от ненужных веществ. Аналитический режим предполагает анализ очищенной смеси молекул для точного разделения на индивидуальные компоненты.

Препаративная ОФ-ВЭЖХ выполнялась с изократической элюцией 100%-м ацетонитрилом и подключённым коллектором фракций, объём фракции — 1 мл. Аналитическая ОФ-ВЭЖХ выполнялась с градиентной элюцией от буфера А — водный 0,1%-й раствор фосфорной кислоты, до буфера В — 0,1%-й раствор фосфорной кислоты в ацетонитриле. Детекция целевых молекул — пептидов — велась спектрофотометрически по поглощению на длинах волн 215, 220, 260 и 280 нм.

Целью препаративной ВЭЖХ было разделение пептидных молекул исследуемых растворов перги и мёда от углеводов и других примесей и их элюция в отдельные фракции с последующим испарением ацетонитрила в термостате и анализе в аналитическом режиме. Целью аналитической ВЭЖХ было исследование спектра пептидных фракций, полученных другими методами.

2.2.5 Осаждение белков трихлоруксусной кислотой

Принцип метода осаждения белков трихлоруксусной кислотой заключается в избирательной денатурации белковых молекул с последующей из агрегацией и осаждением, в то время как низкомолекулярные белки — пептиды, остаются в растворе. После центрифугирования появляется возможность отбросить осадившиеся белки в виде осадка, а пептиды собрать в качестве супернатанта и охарактеризовать с помощью аналитических методов.

Для осаждения белков с трихлоруксусной кислотой использовался 10%-й раствор ТХУ. К 0,5 мл исследуемого раствора мёда и перги добавлялся равный объём раствора ТХУ, проба перемешивалась и оставлялась для инкубации при комнатной температуре на 10 минут, после чего центрифугировалась на скорости в 3000 g в течение 20 минут. Для дальнейшего анализа использовался супернатант, осадок отбрасывался.

2.2.6 Определение концентрации фруктозы реакцией Селиванова

Метод основан на образовании окрашенного продукта реакции фруктозы и резорцина при инкубации на кипящей водяной бане в присутствии сильной неорганической кислоты. Определение концентрации или наличия фруктозы в пробе свидетельствует о качестве разделения раствора мёда или перги, т. к. фруктоза является рядов компонентом углеводного состава соответствующего продукта.

Определение концентрации фруктозы проводилось следующим образом: из каждой фракции или пробы отбиралась аликвота в 0,5 мл, к которой добавляли 0,1%-й спиртовой раствор резорцина и 1,5 мл 30%-й серной кислоты, после чего проба инкубировалась на кипящей водяной бане в течение 10 минут. Интенсивность окраски измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны 490 нм с длиной оптического пути 1 см, в качестве контроля использовали холостую пробу с дистиллированной водой вместо исследуемого раствора. Точное определение концентрации

проводили по методу калибровочной прямой с использованием стандартных растворов фруктозы.

2.2.7 Определение концентрации белка методом Лоури

Для количественного определения содержания белка во фракциях после ионообменной хроматографии использовался метод Лоури, основанный на реакции ионов меди Cu2+ с пептидной связью. При этом медь переходит в Cu+ и реагирует с реактивом Фолина-Чокальтеу (фосфомолибденовая кислота и фенол), образуется нестойкий продукт, переходящий в молибденовую синь, максимум абсорбции которой наблюдается при $\lambda = 750$. При этой длине волны увеличение концентрации белка зависит линейно от показателя оптической плотности. Чувствительность метода высокая (адекватные значения наблюдаются для концентраций белка от 10 до 100 мкг/мл).

Из каждой фракции 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 $CuSO4 \cdot 5H2O$ в 1%-м растворе тартрата или цитрата натрия) иА (2%-й раствор $Na2CO3$ в 0,1 М NaOH) в соотношении 50:1), пробирка перемешивалась и смесь инкубировалась в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее добавлялся реактив Фолина-Чокальтеу в количестве 100 мкл, после чего смесь снова интенсивно перемешивалась и далее инкубировалась при комнатной температуре в течение 40 минут. Измерение оптической плотности проводилось на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете толщиной 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 750$ нм. По полученным значениям оптической плотности была определена концентрация белка в каждой пробе с помощью градуировочного графика, построенного с использованием БСА.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Построение калибровочных прямых по белку и фруктозе

Для количественного определения содержания белковых молекул и углеводов в пробах и фракциях аналитическим методом необходимо построить калибровочные прямые по данным измерения оптической плотности стандартных растворов белка и фруктозы с применением метода Лоури и реакции Селиванова соответственно. Графики и уравнения калибровочных прямых представлены на рис. 1 и 2

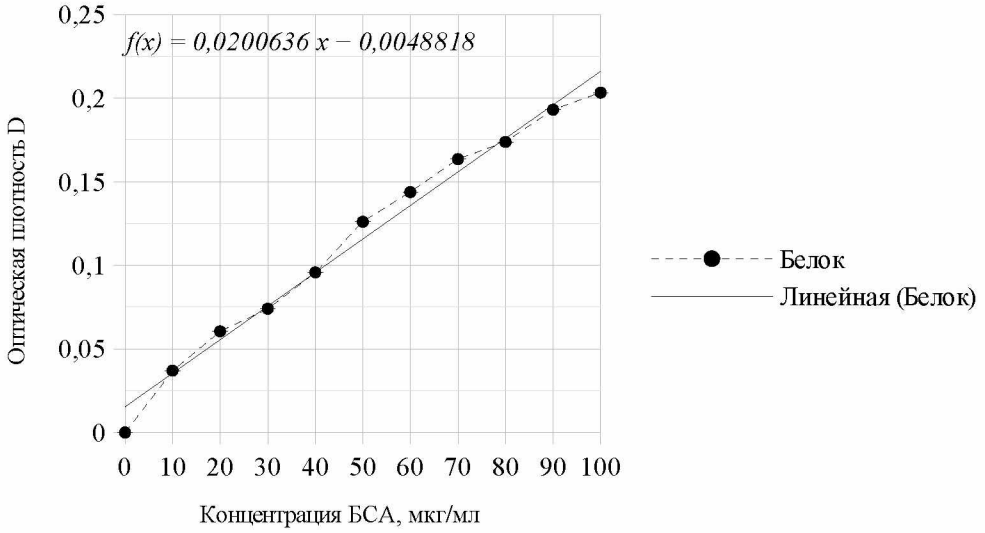

Рисунок 1. Калибровочная прямая по белку (метод Лоури)

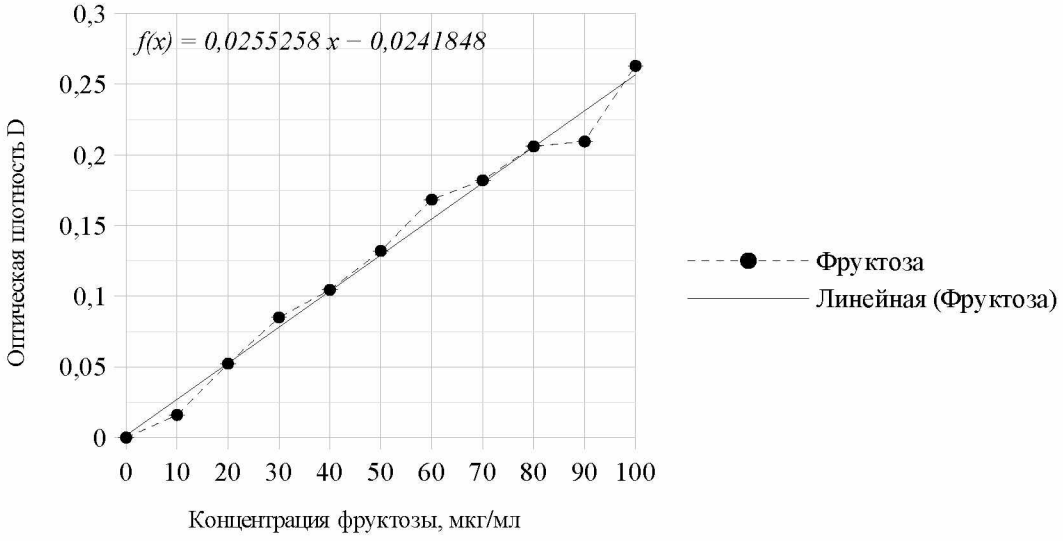

Рисунок 2. Калибровочная прямая по фруктозе (реакция Селиванова)

3.2 Ионообменная хроматография

3.2.1 Ход разделения и результаты

Результаты разделения исследуемых фракций перги и мёда представлены на рис. 3-6.

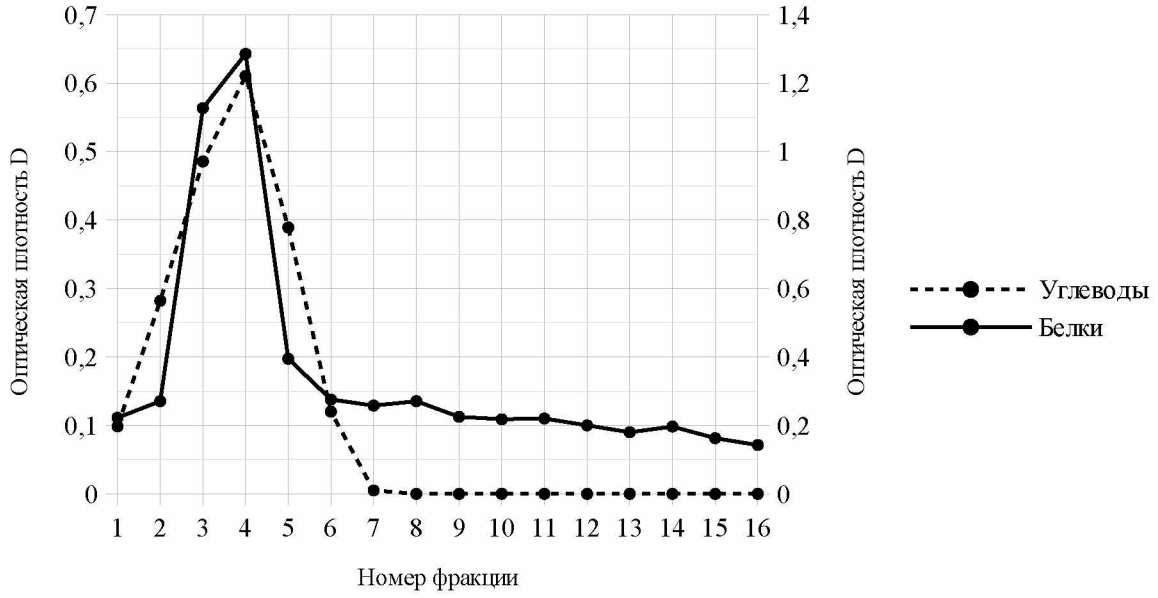

Рисунок 3. Хроматограмма разделения раствора мёда с молекулами массой менее 5 кДа (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

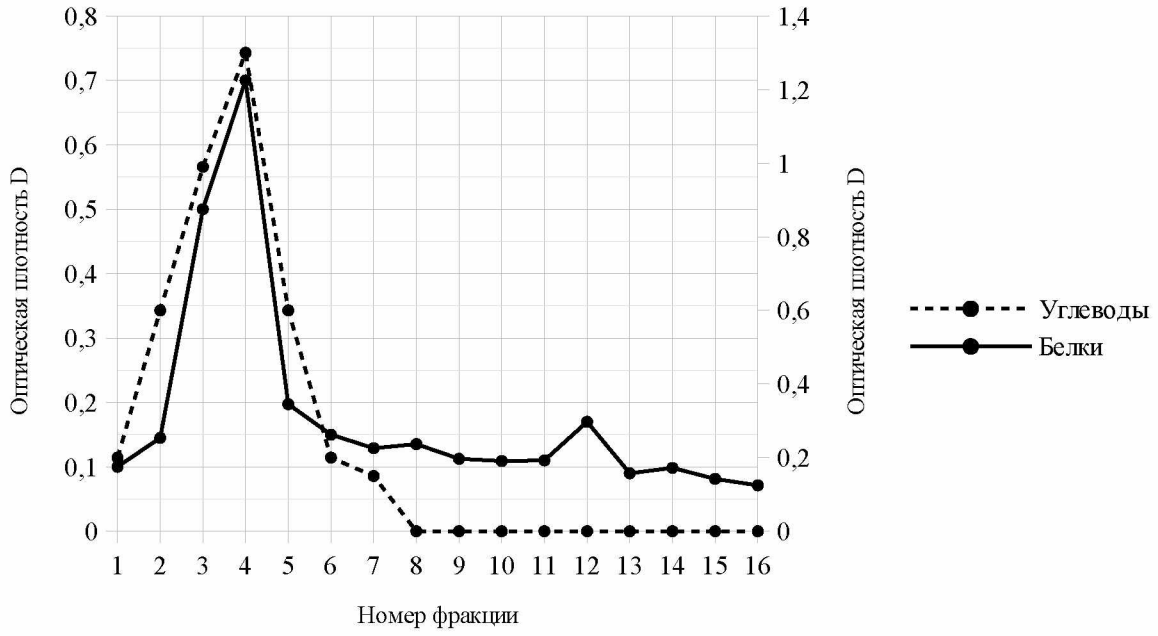

Рисунок 4. Хроматограмма разделения раствора мёда с молекулами массой от 5 кДа до 10 кДа (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

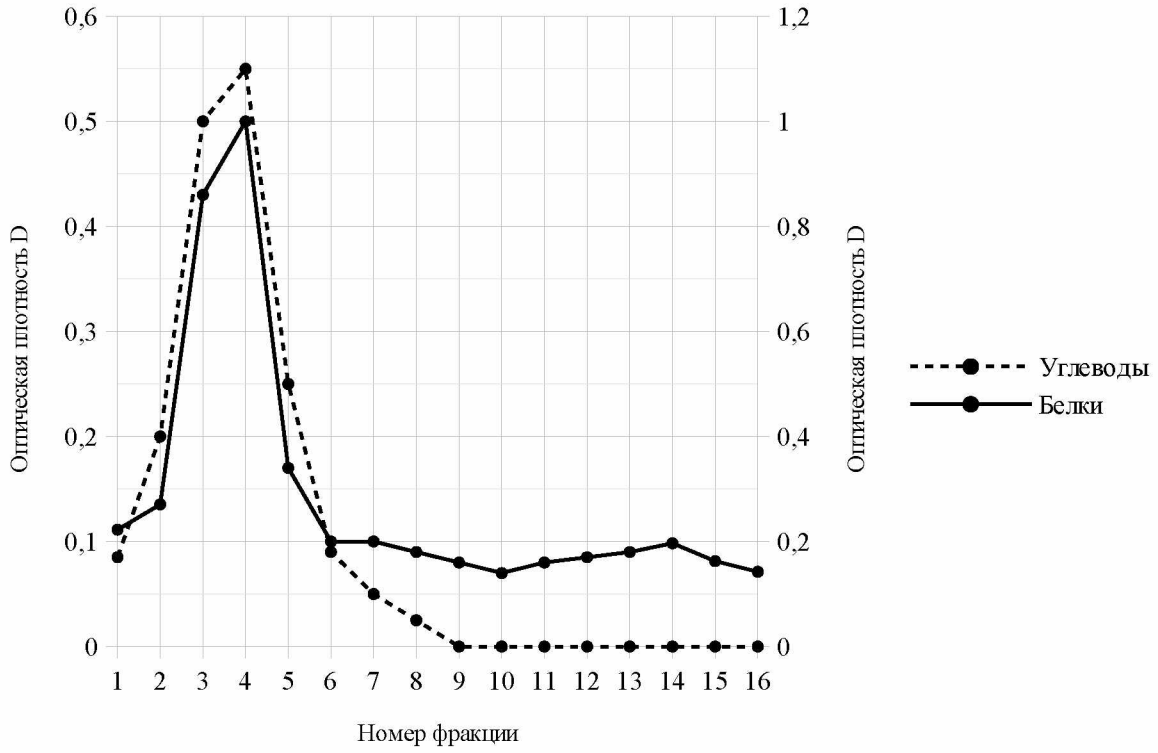

Рисунок 5. Хроматограмма разделения раствора перги с молекулами массой менее 5 кДа (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

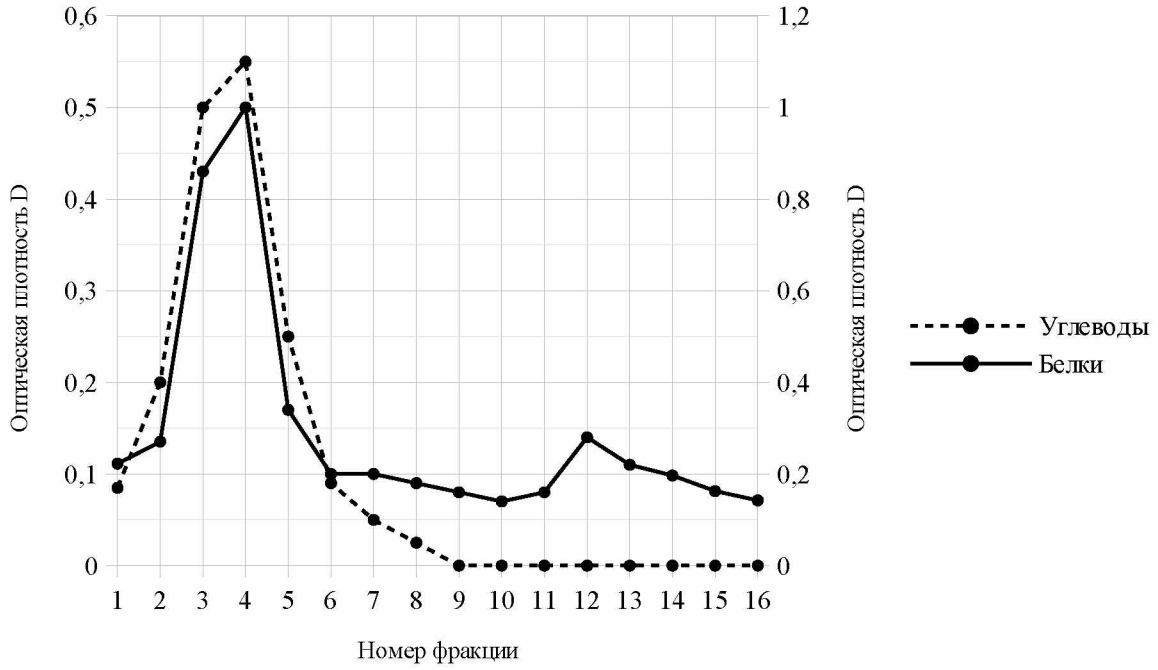

Рисунок 6. Хроматограмма разделения раствора перги с молекулами массой от 5 кДа до 10 кДа (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

Анализ полученных хроматограмм позволяет сделать вывод, что метод анионообменной хроматографии не является подходящим для эффективного выделения пептидов пчелиного мёда и перги, т. к. не позволяет разделить пептиды и углеводы. Ожидаемым оптимальным результатом для этого метода была бы хроматограмма, на которой было бы изображено как минимум два пика, соответствующие элюции пептидов; первый пик — начальные фракции, соответствующие свободному объёму колонки — несвязавшиеся пептиды, элюировавшиеся вместе с другими балластными веществами, в первую очередь углеводами; второй и последующие пики после смены буферного раствора — связавшиеся и/или разделившиеся в зависимости от заряда пептиды, элюировавшиеся в отдельных фракциях, в которых не присутствует балластных веществ, не нужных для определения биологической активности выделенных фракций. Однако из рис. 4 и 6 следует, что эффективного разделения углеводов и пептидов не происходит даже после очистки исследуемых проб от углеводов методом ультрафильтрации. Вероятно, концентрация углеводов остаётся слишком высокой для того, чтобы пептиды эффективно связывались с ионогенными группами носителя, потому что, во-первых, углеводы в такой высокой концентрации экранируют ионогенные группы, во-вторых, уменьшают прочность связывания ионизированных пептидов и групп носителя, что и выражается в высокой концентрации не связавшихся с DEAE-целлюлозой, выходящих в свободном объёме колонки, и постепенной диссоциацией комплекса «пептид-целлюлоза» до смены буферного раствора.

Из рис. 3 и 5, на которых представлены результаты разделения растворов мёда и перги соответственно с молекулами массой менее 5 кДа чётко видно, что ещё большая по сравнению с предыдущими пробами концентрация углеводов полностью подавляет сорбцию пептидов на колонке и не позволяет ни разделить пептиды по заряду, ни очистить часть пептидов

от углеводов, потому что концентрация пептидов, вышедших в свободном объёме колонки, хоть и меньше относительно аналогичных растворов перги и мёда (с молекулами массой от 5 до 10 кДа), но не наблюдается «хвоста» из связавшихся, но практически сразу десорбировавшихся пептидов, т. е. сорбции не происходит вообще.

3.2.2 Ионообменная хроматография разбавленных растворов перги и мёда

Попытка подбора оптимальной концентрации углеводов для того, чтобы пептиды эффективно разделялись на используемой DEAE-целлюлозе не увенчалась успехом, потому что даже при разбавлении в 5 и 10 раз сорбции пептидов на носителе всё равно не происходит вследствие большой концентрации углеводов в пробе (рис. 7-10), однако происходит уменьшение абсолютной концентрации пептидов, что отражается в уменьшении высоты пиков, а как следствие и концентрации белков, что также не отвечает критериям эффективного разделения пептидов и балластных веществ.

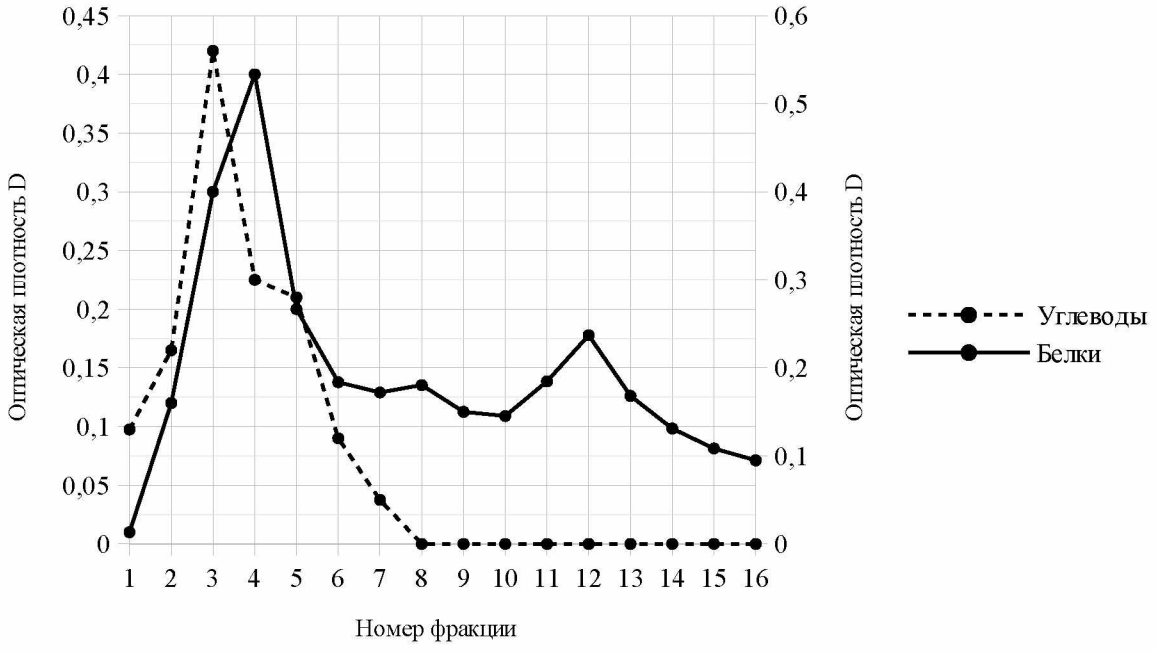

Рисунок 7. Профиль элюции разбавленного в 5 раз раствора мёда (шкала

оптической плотности по фруктозе справа)

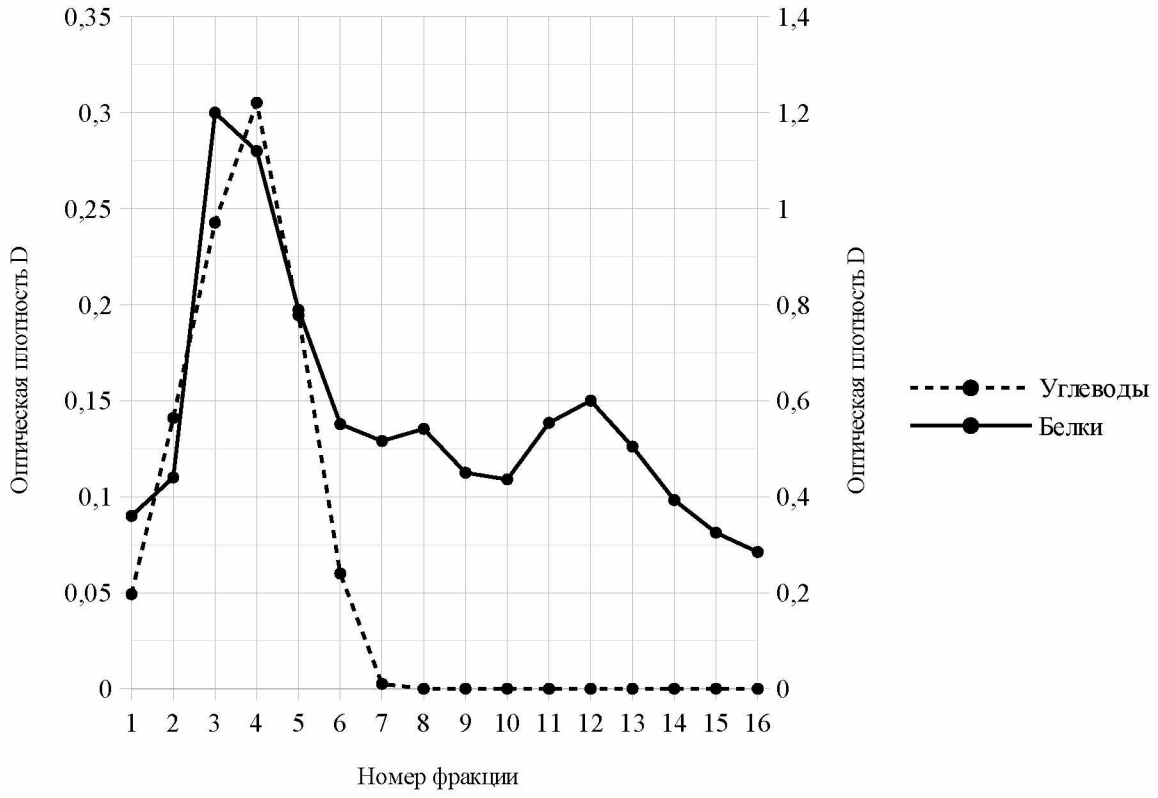

Рисунок 8. Профиль элюции разбавленного в 10 раз раствора мёда (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

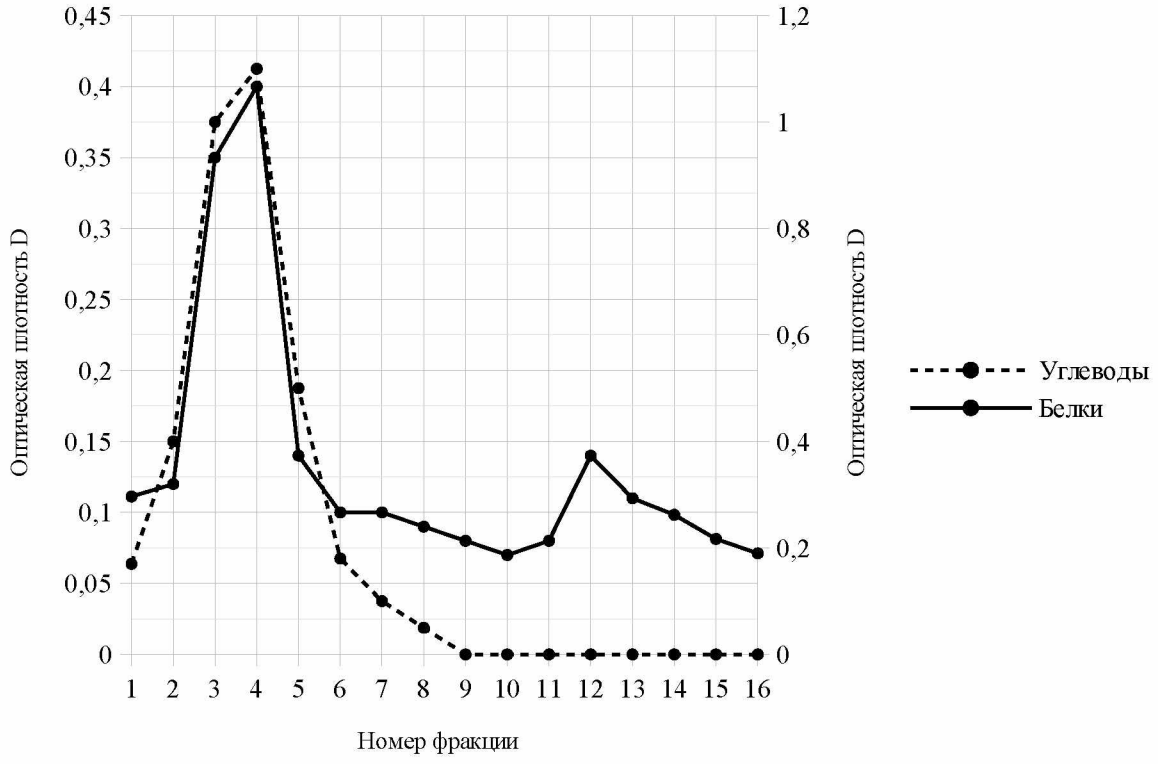

Рисунок 9. Профиль элюции разбавленного в 5 раз раствора перги (шкала

оптической плотности по фруктозе справа)

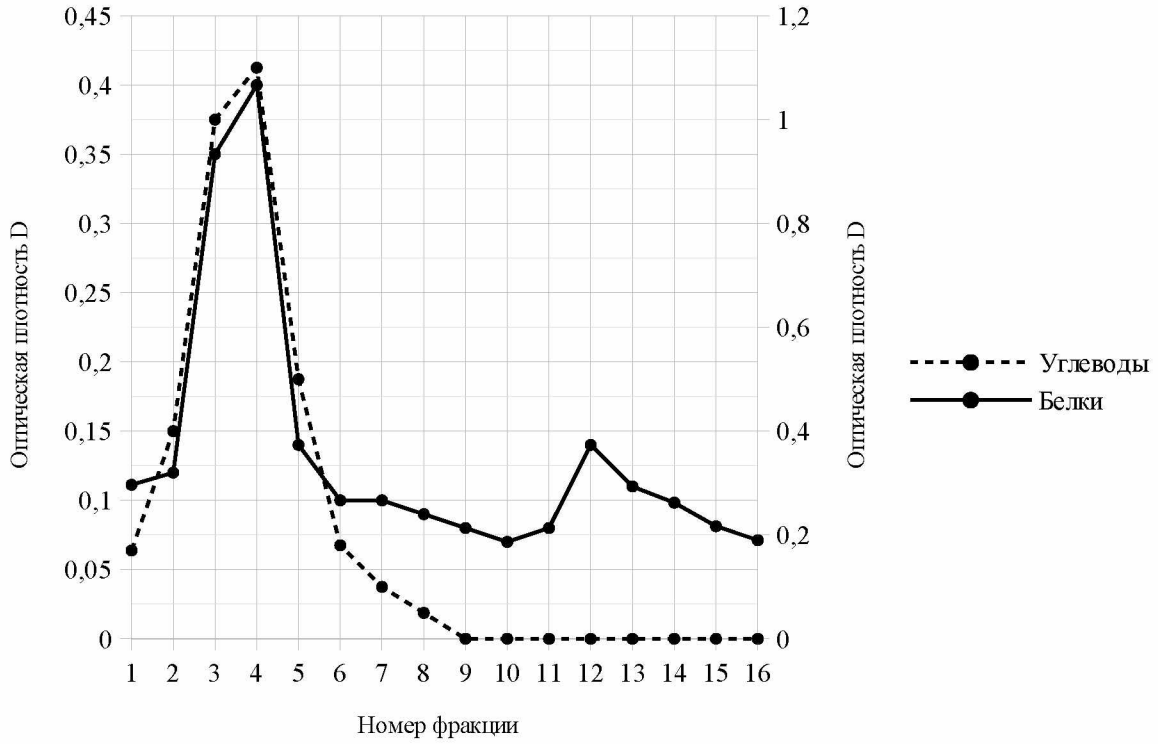

Рисунок 10. Профиль элюции разбавленного в 5 раз раствора перги (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

3.2.3 Катионообменная хроматография

Для исключения влияния на эффективность выделения пептидов из исследуемых растворов природы неподвижной фазы была проведена катионообменная хроматография с использованием КМ-целлюлозы и следующих буферных растворов: начальный — 0,2 М Na-цитратный, pH = 4, элюирующий — 0,2 М ТРИС-HCl, pH = 9, смена буфера после седьмой фракции. В качестве пробных вариантов для разделения были использованы растворы мёда и перги с массой молекул от 5 кДа до 10 кДа. Полученные профили элюции изображены на рис. 11 и 12 и демонстрируют аналогичную картину разделения как при хроматографии на DEAE-целлюлозе, что подтверждает теорию, в соответствии с которой эффективной сорбции пептидов на ионообменнике мешает большая концентрация углеводов, и данное явление не зависит от природы ионообменника.

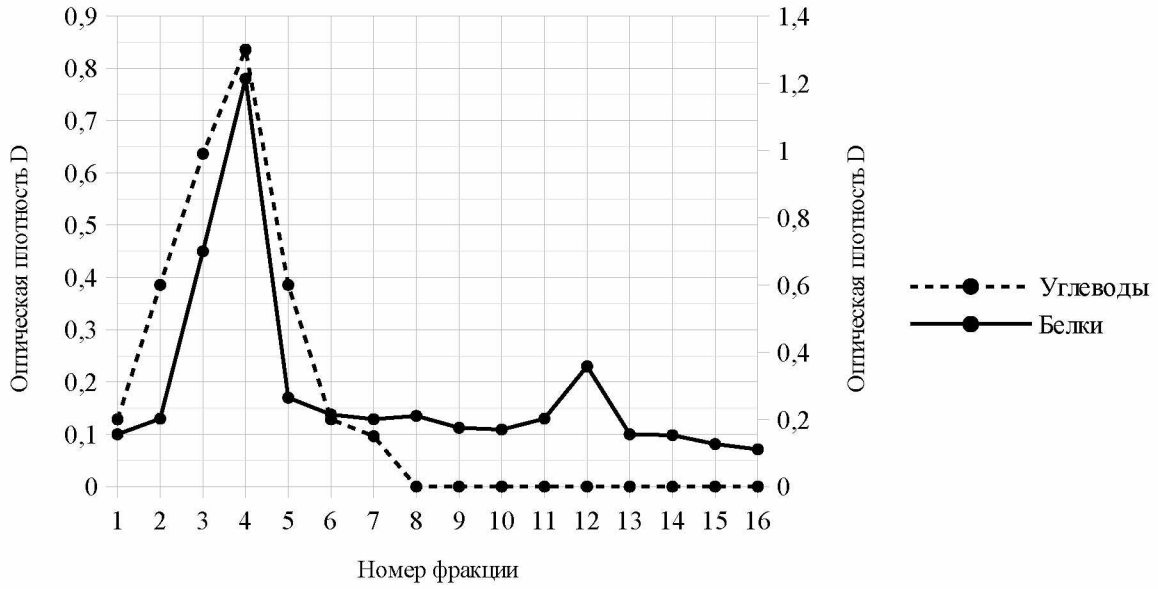

Рисунок 11. Хроматограмма разделения раствора мёда с молекулами массой от 5 кДа до 10 кДа (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

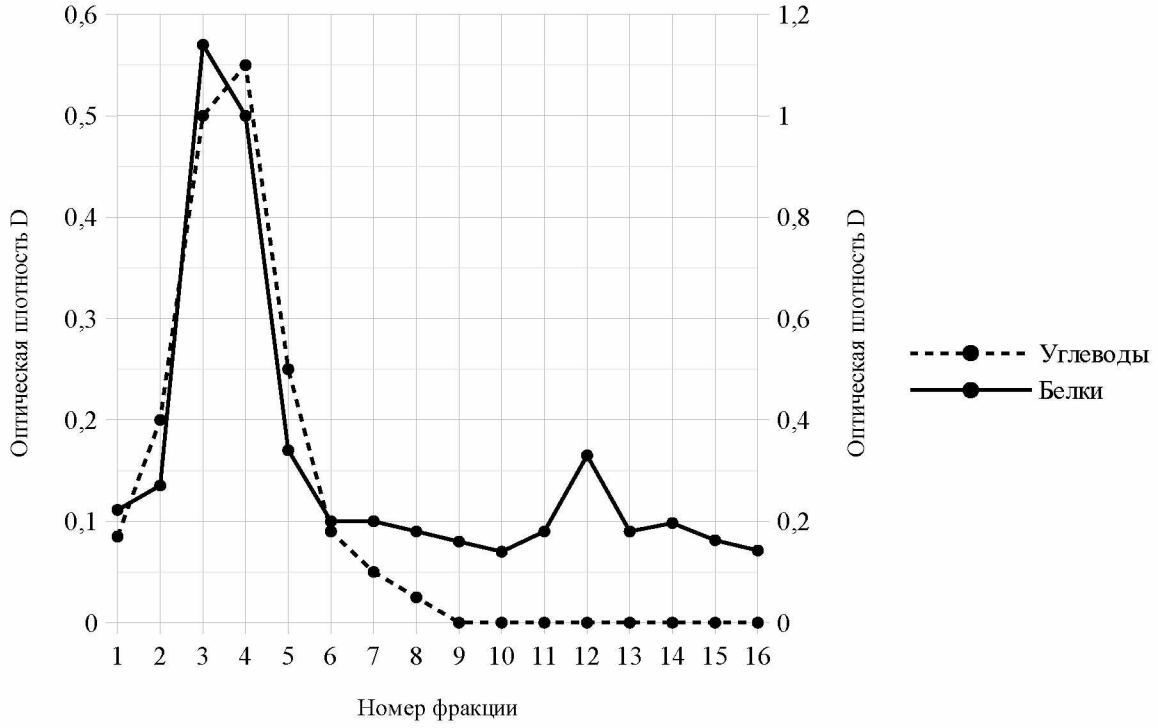

Рисунок 12. Хроматограмма разделения раствора перги с молекулами массой от 5 кДа до 10 кДа (шкала оптической плотности по фруктозе справа)

Таким образом можно заключить, что ионообменная хроматография не

подходит как метод выделения пептидов из пчелиного мёда и перги в силу высоких значений концентраций углеводов, мешающих эффективному разделению компонентов смеси.

3.3 Осаждение белков трихлоруксусной кислотой

Для осаждения белков трихлоруксусной кислотой использовался 10%-й раствор ТХУ. К 0,5 мл исследуемого раствора мёда и перги добавлялся равный объём раствора ТХУ, проба перемешивалась и оставлялась для инкубации при комнатной температуре на 10 минут, после чего центрифугировалась на скорости в 3000 g в течение 20 минут. Для дальнейшего анализа использовался супернатант, осадок отбрасывался.

В качестве контроля результатов выделения пептидов методом осаждения белков ТХУ использовались методы ВЭЖХ и Лоури.

Результаты контроля концентрации белка методом Лоури в пробах представлены в Таблице 4, хроматограммы супернатантов изображены на рис. 13 и 14.

ВЭЖХ-анализ проводился в градиентном режиме элюции от буфера А — водный 0,1%-й раствор фосфорной кислоты, до буфера В — 0,1%-й раствор фосфорной кислоты в ацетонитриле. Детекция целевых молекул — пептидов — велась спектрофотометрически по поглощению на длине волны 215 нм, скорость потока — 1 мл/мин, колонка SUPELCOSIL LC-18-T размерами 250x4,6 мм, размер частиц 5 мкм.

Таблица 4 — Концентрация белков и фруктозы при осаждении ТХУ

Раствор	Концентрация белка, мкг/мл		Концентрация фруктозы, мкг/мл	
	Общая	Супернатант	Общая	Супернатант
Мёд, 30%	675	27	1348	1029
Перга, 20%	254	27	557	560

Как следует из Таблицы 4 и хроматограмм (рис. 13 и 14), такой метод выделения пептидов, как осаждение белков трихлоруксусной кислотой тоже не является эффективным. Во-первых, концентрация побочных компонентов растворов перги и мёда не уменьшается, что выражается в незначительных колебаниях концентрации фруктозы — маркера углеводов. Во-вторых, осаждение ТХУ по сравнению с методом ультрафильтрации не позволяет точно предсказать молекулярную массу оставшихся в супернатанте белковых веществ. В-третьих, концентрация белков в супернатанте во всех случаях оказывается слишком маленькой для дальнейшего анализа с помощью метода ВЭЖХ. В-четвёртых, ТХУ имеет сильное поглощение на длинах волн, используемых для детекции пептидных веществ, что затрудняет анализ профиля элюции белков и пептидов и может привести к ошибочным результатам вследствие появления лишних пиков на хроматограмме (рис. 15 — холостая проба, содержащая водный раствор ТХУ) и неправильной интерпретации результатов при подсчёте количества пиков, расчёта их параметров и сравнении хроматограмм.

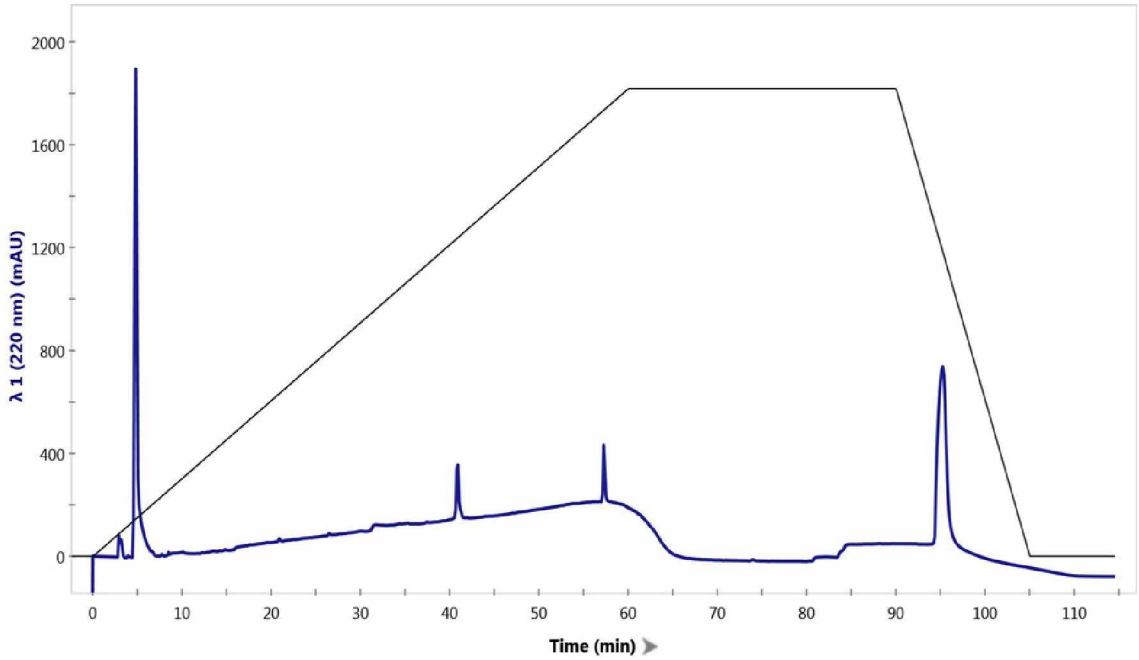

Рисунок 13. Хроматограмма разделения супернатанта после осаждения белков мёда ТХУ

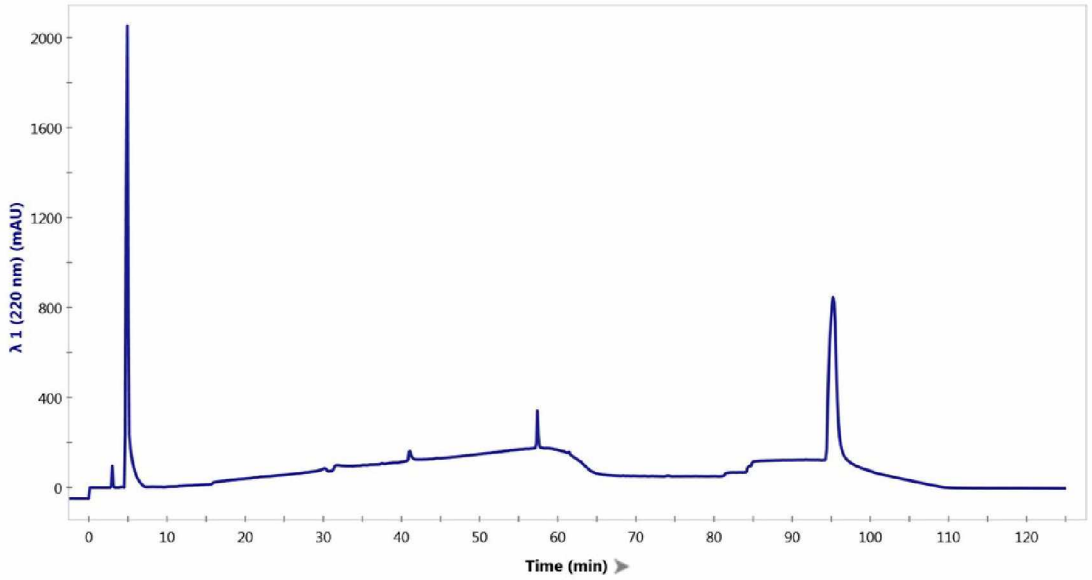

Рисунок 14. Хроматограмма разделения супернатанта после осаждения белков перги ТХУ

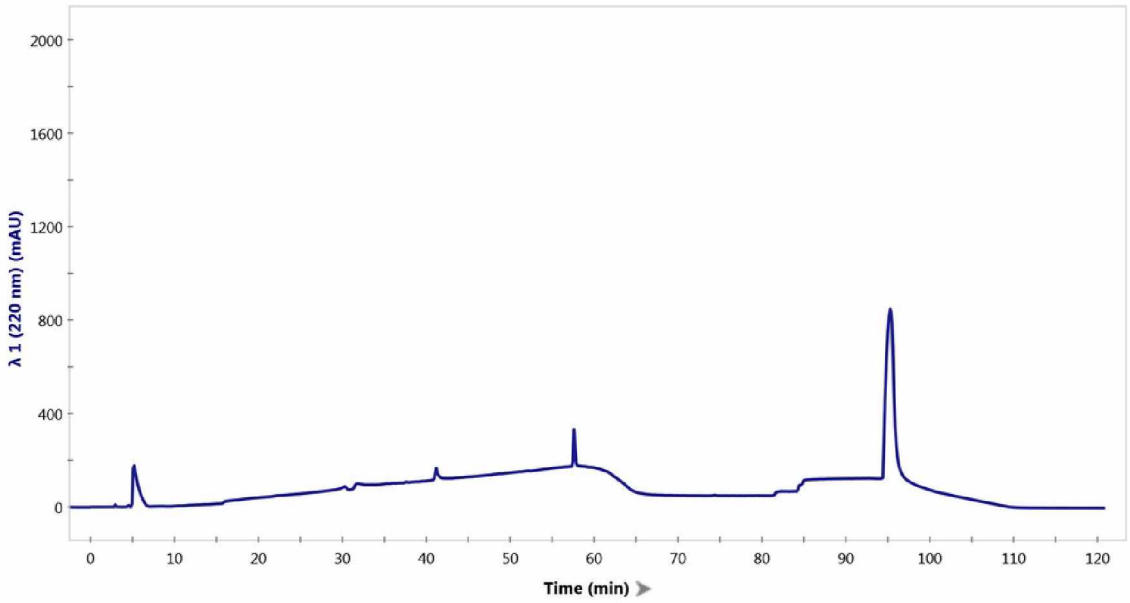

Рисунок 15. Хроматограмма разделения холостой пробы, содержащей водный раствор ТХУ

3.4 Результаты твердофазной экстракции пептидов

Твердофазная экстракция проводилась с использованием картриджей SPE C18 объёмом 1 мл. На этапе подготовки картриджа проводилось его кондиционирование: промывка водным 70%-м раствором ацетонитрила с 0,1% фосфорной кислоты в количестве двух объёмов картриджа, затем

наносился разделяемый раствор мёда или перги в объёме 1 мл и производилась начальная элюция 0,1%-м водным раствором фосфорной кислоты в количестве двух объемов картриджа. Финальная элюция производилась кондиционирующим раствором (водный 70%-м раствор ацетонитрила с 0,1% фосфорной кислоты) в объёме 1 мл со сбором элюции в отдельную фракцию.

Твердофазная экстракция также не позволила разделить мешающие вещества (преимущественно углеводы) и пептидные фракции растворов мёда и перги (хроматограммы на рис. 16-19) не смотря на разные значения logP фруктозы — маркера углеводов и модельного пептида — вазопрессина (-2,04 и -5,06 соответственно).

Отсутствие факта разделения углеводов и пептидов методом твердофазной экстракции можно тоже объяснить высокой концентрацией углеводов. При большом количестве молекулы углеводов мешают молекулам других веществ эффективно взаимодействовать с функциональными группами неподвижной фазы, вследствие чего не происходит задержки пептидных молекул при прохождении через носитель, и они выходят вместе с элюирующим раствором и другими несорбировавшимися молекулами в свободном объёме, что и видно на хроматограммах и подтверждается последующим измерением концентрации фруктозы и белков (Таблица 5).

Таблица 5 — Концентрации белков и фруктозы в различных фракциях до и после твердофазной экстракции

Раствор	Свободный объём		Элюция	
	Белок, мкг/мл	Фруктоза, мкг/мл	Белок, мкг/мл	Фруктоза, мкг/мл
Мёд, <5 кДа	334	1450	0	21
Мёд, 5-10 кДа	266	889	0	14
Перга, <5 кДа	122	1553	0	13
Перга, 5-10 кДа	98	699	0	9

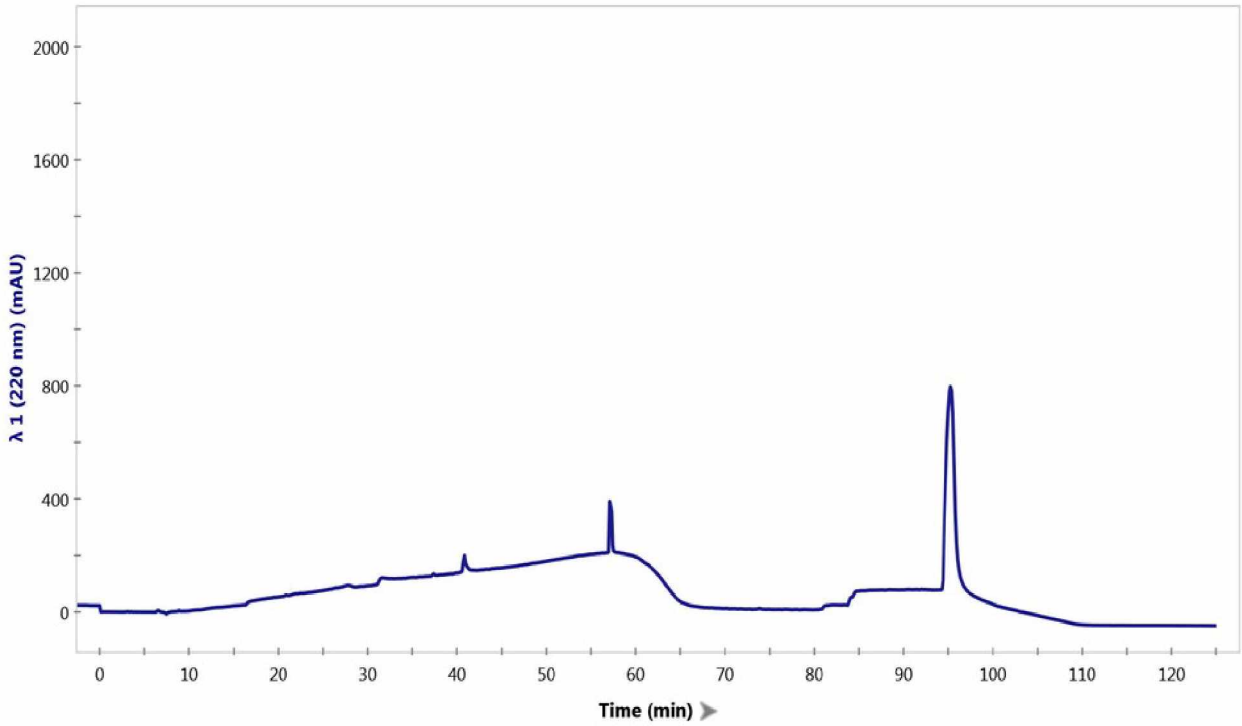

Рисунок 16. Хроматограмма разделения фракции элюции раствора мёда с молекулами массой 5-10 кДа

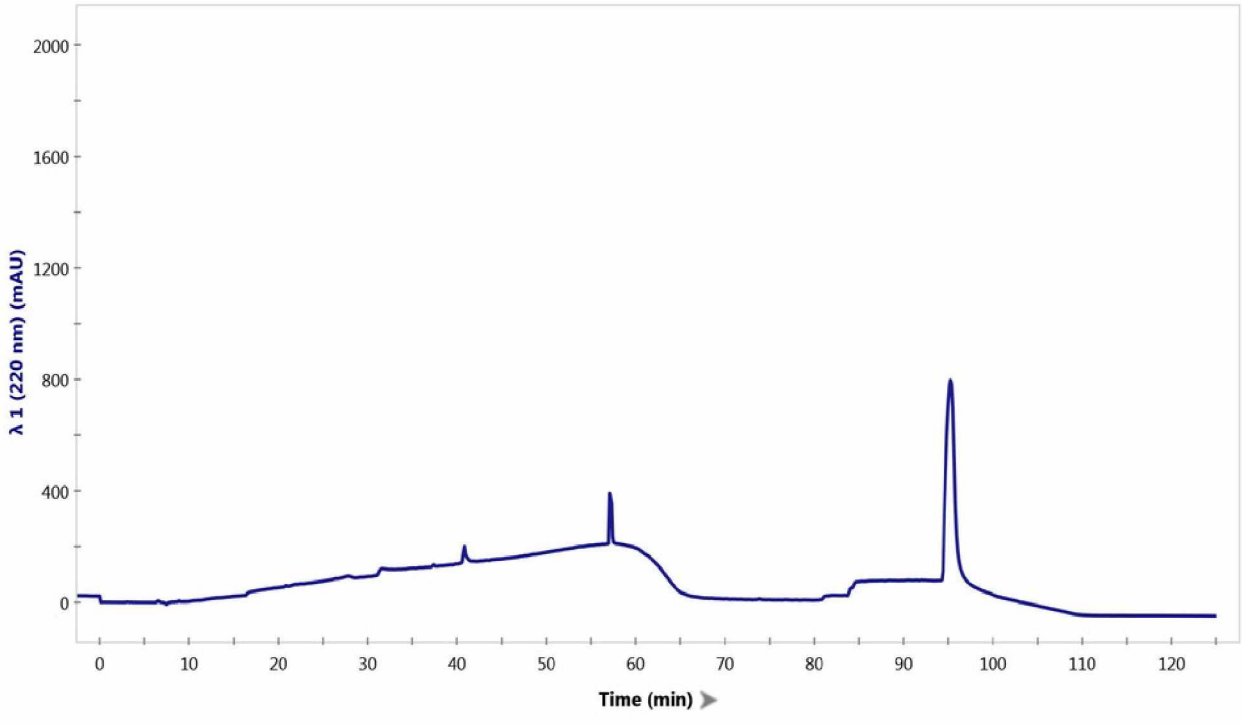

Рисунок 17. Хроматограмма разделения фракции элюции раствора мёда с молекулами массой до 5 кДа

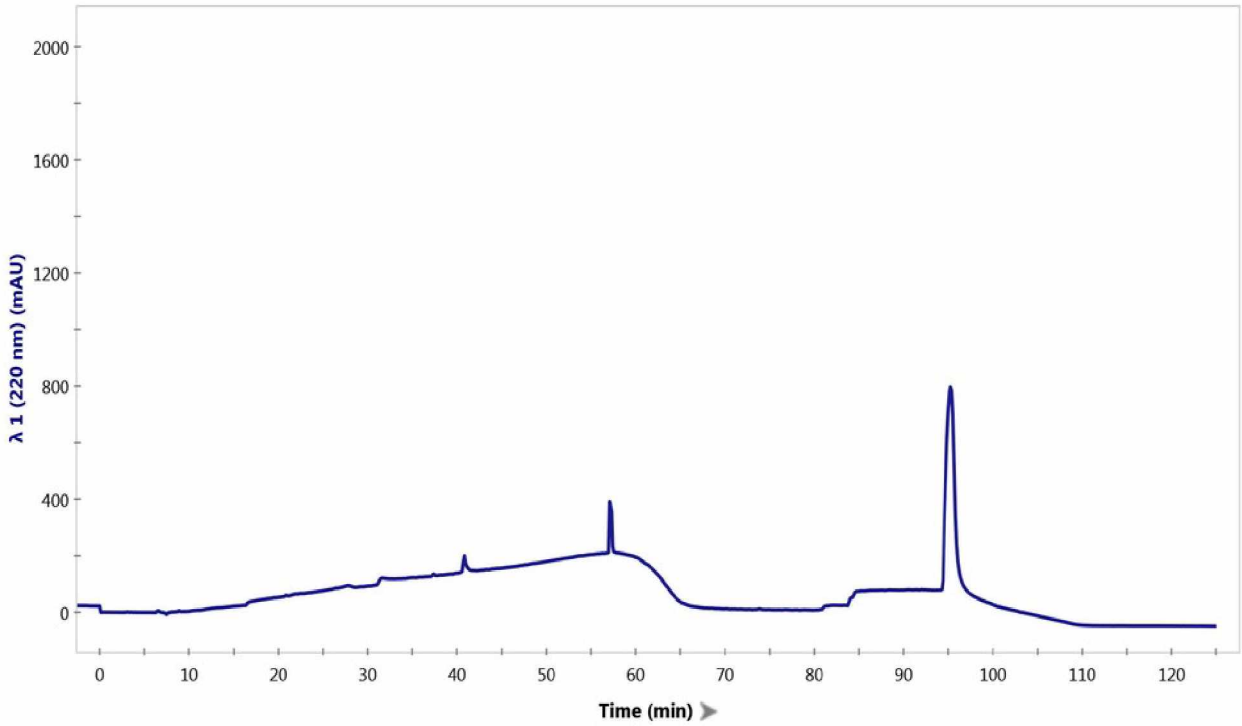

Рисунок 18. Хроматограмма разделения фракции элюции раствора перги с молекулами массой 5-10 кДа

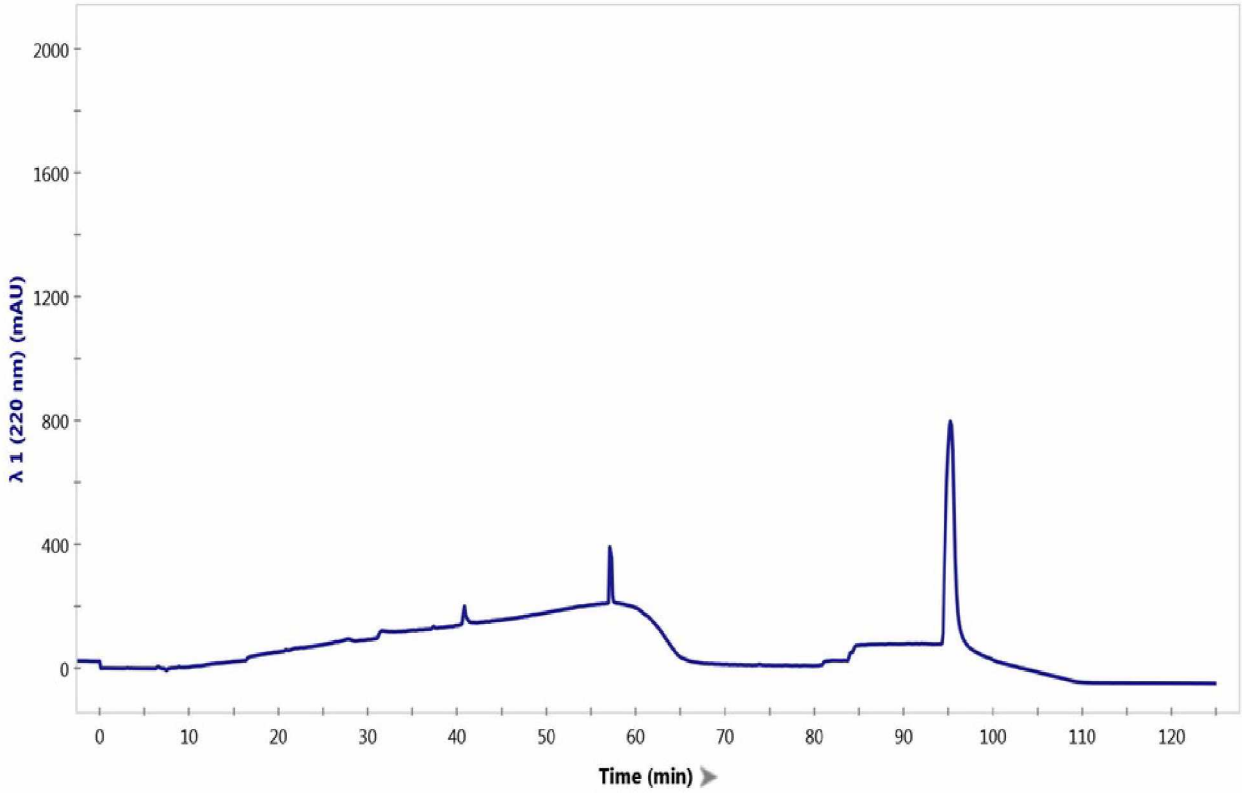

Рисунок 19. Хроматограмма разделения фракции элюции раствора перги с молекулами массой до 5 кДа

3.5 Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография

Для анализа исследуемых растворов методов высокоэффективной жидкостной хроматографии в препаративном режиме в заведомо неразделяющих условиях (изократическое элюирование в 100%-м ацетонитриле) было решено не использовать растворы мёда и перги с молекулами массой меньше 5 кДа из-за низкого содержания пептидных молекул и высокого содержания углеводов.

Для подготовки раствора перги и мёда к разделению на ВЭЖХ-колонке проводилась делипидизация и фильтрация через стерильный фильтр 0,45 мкм. Необходимость делипидизации заключается в увеличении срока службы колонки, т. к. любые неполярные соединения, например, липиды и жирные кислоты, содержащиеся в исследуемом образце, необратимо загрязняют колонку и уменьшают срок её службы, попутно ухудшая результаты последующий разделений. Делипидизация заключается в смешении равного объёма подготавливаемой пробы и гексана, взбалтыванием в течение 10 минут, инкубации при комнатной температуре и центрифугировании в течение 15 минут при 1000 g. После центрифугирования супернатант отбрасывался, к оставшемуся центрифугату приливался равный объём этилацетата, смесь взбалтывалась в течение 5 минут, инкубировалась при комнатной температуре 5 минут и центрифугировалась в течение 10 минут при 1000 g. Супернатант снова отбрасывался и центрифугат фильтровался через стерильный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный раствор наносился на хроматографическую колонку, детекция велась спектрофотометрическим детектором по поглощению на длине волны 215 нм — длине волны поглощения пептидной связи, скорость потока — 1 мл/мин.

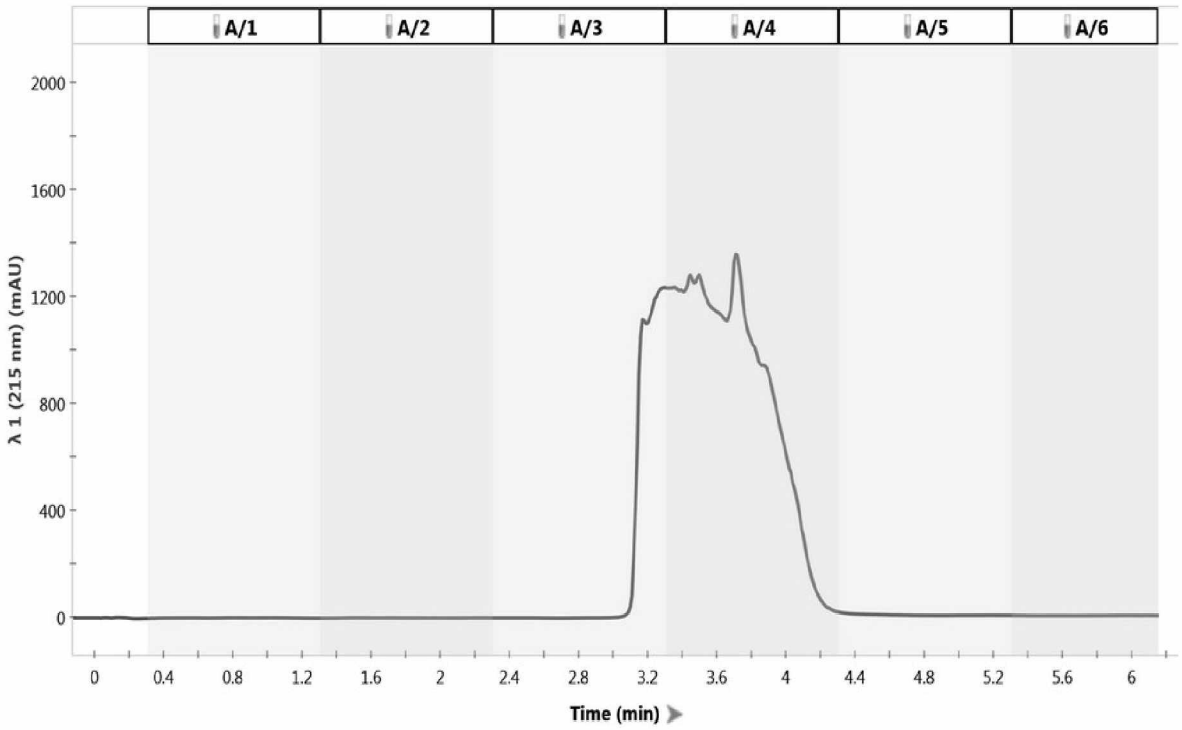

Рисунок 20. Хроматограмма изократической элюции раствора мёда (5-10 кДа)

Анализ хроматограмм и последующее измерение концентрации фруктозы в собранных коллектором фракции пробах (рис. 20-23) позволяют сказать, что данный метод тоже не подходит для выделения и очистки пептидных фракций перги и пчелиного мёда, т. к. не происходит разделения пептидов и углеводов. Причина наблюдаемого явления, видимо, так же заключается в относительно высокой концентрации углеводов, молекулы которых мешают эффективно связываться целевым молекулам — пептидам — материалом матрицы. Кроме того, применённый вариант препаративной ВЭЖХ на аналитической колонке не является оптимальным с точки зрения эффективности использования самого метода как такового, потому что длительное использование 100% ацетонитрила или другого органического растворителя ведёт к износу колонки и потере её свойств.

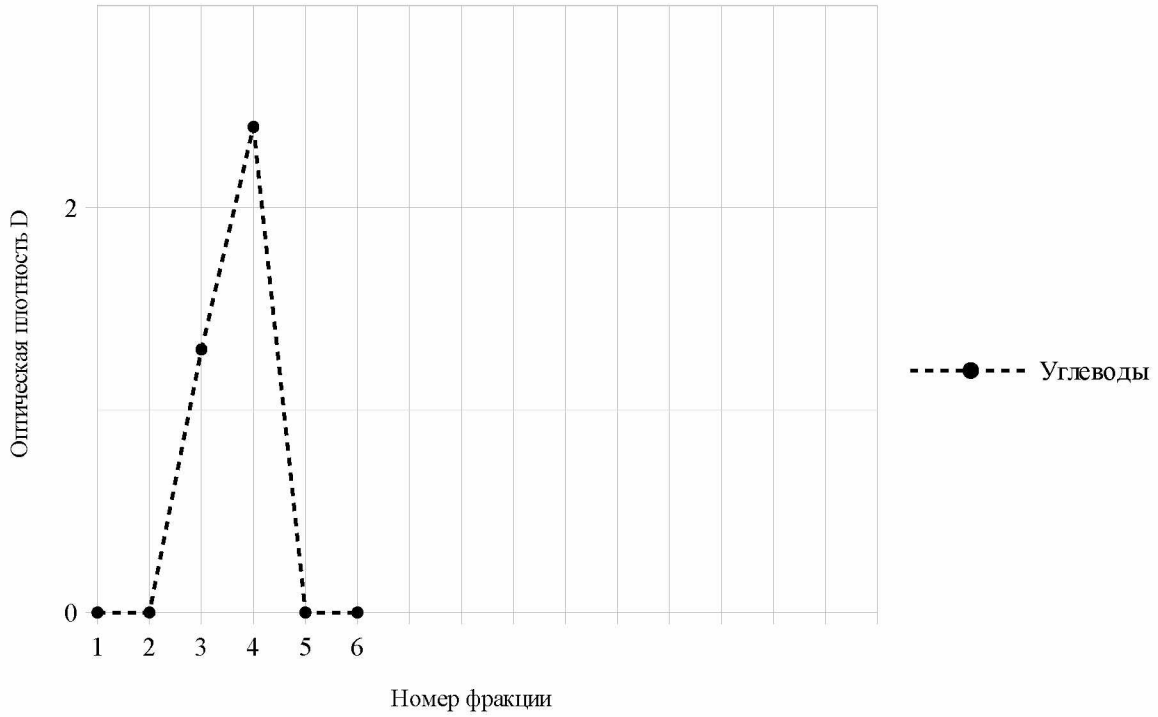

Рисунок 21. Концентрация фруктозы по фракциям после разделения раствора мёда (5-10 кДа) на ВЭЖХ-колонке

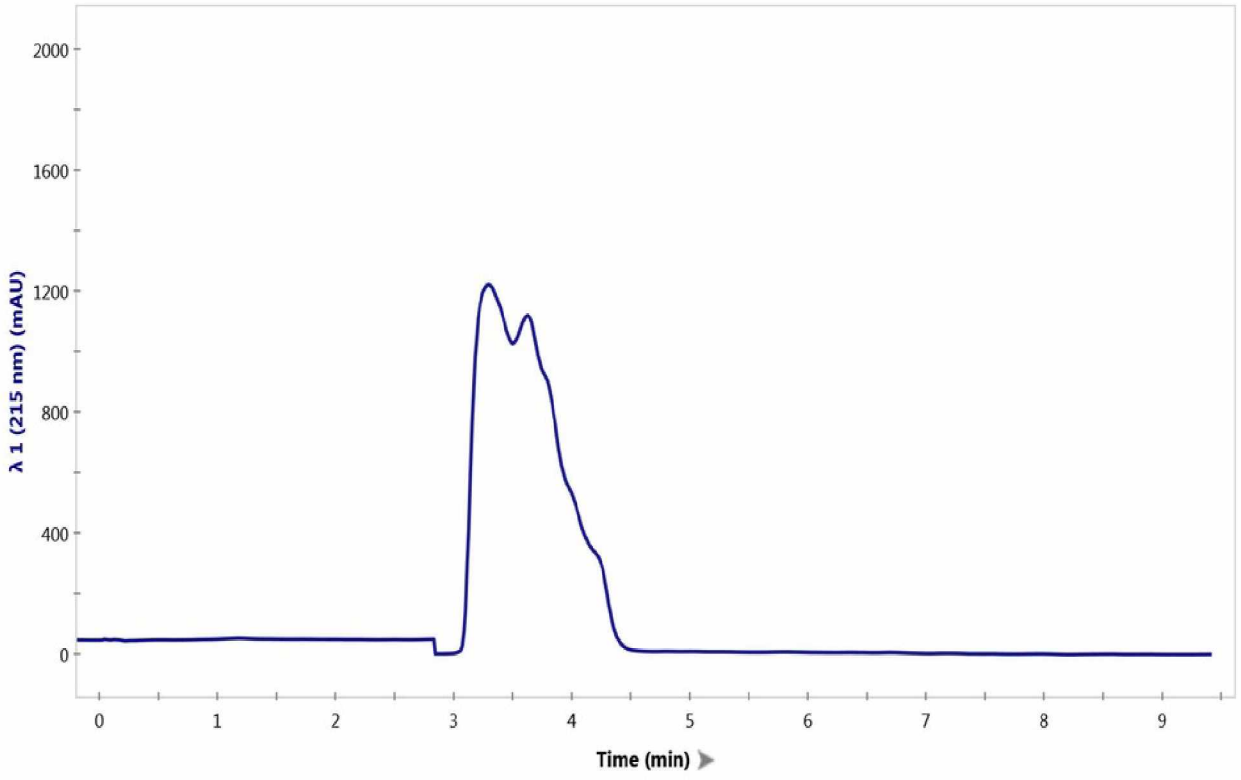

Рисунок 22. Хроматограмма изократической элюции раствора перги (5-10 кДа)

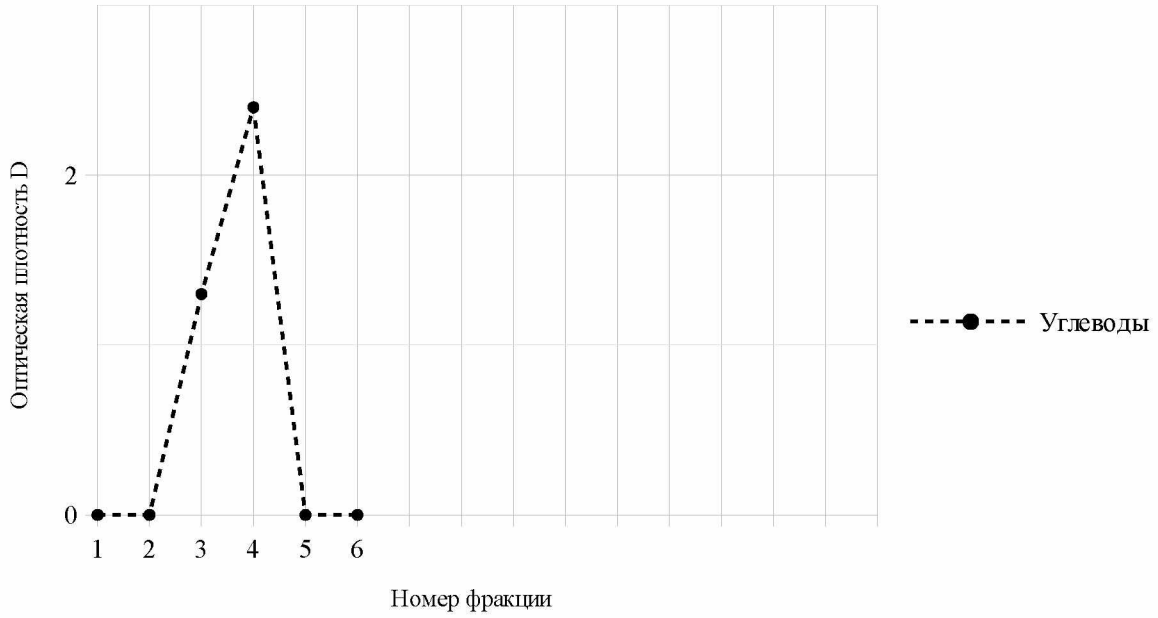

Рисунок 23. Концентрация фруктозы по фракциям после разделения раствора перги (5-10 кДа) на ВЭЖХ-колонке

3.6 Сравнение методов выделения и очистки пептидов

В Таблице 6 приведено сравнение исследованных методов, применяемых в биохимии для выделения пептидов из различного биоматериала, применительно к использованным продуктам пчеловодства — пчелиному мёду и перге.

Таблица 6 — Сравнение исследованных методов

Метод	Критерий	
	Эффективность выделения пептидов	Очистка пептидов от примесей
Ультрафильтрация	Да	Частично
Ионообменная хроматография	Нет	Нет
Осаждение белков ТХУ	Нет	Нет
Твердофазная экстракция	Нет	Нет
ВЭЖХ	Нет	Нет

Из Таблицы 10 видно, что метод ультрафильтрации позволяет провести только разделение белковых молекул водного раствора пчелиного мёда и перги на белки и пептиды, но не позволяет их очистить от других компонентов смеси, в то время как методы ионообменной хроматографии, осаждения белков ТХУ, твердофазная экстракция и ВЭЖХ не позволяют выделить и/или очистить пептиды от других веществ вовсе.

ВЫВОДЫ

В качестве выводов можно сказать, что:

1. Ни один из исследованных методов разделения биомолекул не показал свою эффективность при разделении сложных смесей — растворов мёда и перги.
2. Основное препятствие на пути к выделению изолированной и как можно полной пептидной фракции мёда и перги — высокая концентрация углеводов.
3. Выявлено, что мёд и перга содержат определённое количество пептидных соединений.
4. Не смотря на относительно высокое содержание пептидов в пчелином мёде и меньшее — в перге, основная задача стоит не в выделении этих пептидов, а в очистке их от примесей, в первую очередь углеводов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поль Ф. Болезни пчёл, диагностика и лечение. М.: Издательство Астрель, 2004. 199 с.
2. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey / C. J. Adams, C. H. Boult, 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., Manley—Harris M., Molan P. C. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey // Carbohydr Res. 2009. Vol. 344. No. 8. P. 1050–1053.
4. Ali A. T., Chowdhury M. N., al Humayyd M. S. Inhibitory effect of natural honey on Helicobactor pylori // Tropical gastroenterology. 1991. Vol. 12. No. 3. P. 139–142.
5. 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., Hughes D., Kubicek—Sutherland J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides // 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. 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. 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 // ACS Infect. Dis. Published online.
12. Blondelle S. E., Lohner K., Aguilar M. I. Lipid–induced conformation and lipid–binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 1999. Vol. 1462. Issue 1–2. P 89–108.
13. 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. 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. 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., Sjaarda C. 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 // PLoS One. 2015. Vol. 10. No. 4. Published online
18. 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. 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. 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 biolocical chemistry. 1994. Vol. 269. No. 46. P. 28569–28575.
21. 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. 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. 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., el Sayed M. A. A., Seetharaman K. Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat // Journal of Cereal Science. 2012. Vol. 56. No. 2. P. 181–188.
25. 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. 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., Krukemeyer A., Ramamoorthy A. The human beta–defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions // Biochim Biophys Acta. 2006. Vol. 1758. Issue 9. P. 1499–1512.
28. 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., Karunaratne D. N., Hancock R. E. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin // J Biol Chem. 1996. Issue 271. P. 19298–19303.
30. 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. 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. 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 // Current Biology. 2013. Vol. 23. Issue 24. P. 1063–1065.
34. 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., Terán M. L. Antimicrobial peptides: immunomodulatory

properties, functions and therapeutic applications in humans // Antimicrobial Peptides / edited M. D. Seong, Y. I. Hak NY: Nova Science Publishers, 2013. 168 p.

36. Hilchie A. L., Wuerth K., Hancock R. E. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides // Nat Chem Biol. 2013. Vol. 9. No. 12. P. 761–768.

37. Hoyle B. D., CostertonJ. W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms // Prog Drug Res. 1991. Issue 37. P. 91–105.

38. Insect Immunity. Purification and Propeties 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., Hamill P., Hancock R. E. Peptide Antimicrobial Agents // Clin Microbiol Rev. 2006. Vol. 19. No. 3. 491–511.

40. Junaid A., Rafiq Q. A., Ratcliff A. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments // Future Sci OA. 2018. Issue 4. Published online.

41. 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., Van Boeckel T. P., Martinez E. M., Pant S., Gandra S., Levin S. A., Goossens H, Laxminarayan R. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Published online.

43. Kumar P., Kizhakkedathu J. N., Straus S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo // Biomolecules. 2018. Vol 8. Issue 1. P. 4.

44. Kwakman P. H., Zaat S. A. Antibacterial components of honey // IUBMB Life. 2012. Vol. 64. No. 1. P. 48–55.

45. 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., Hall K. N., Aguilar M. I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure // Curr Top Med Chem. 2016. Vol. 16. No. 1. P. 25–39.
47. 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., Marshall B. M. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses // 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 // Cell. 2001. Vol. 106. No. 3. P. 259–262.
50. Antibiotic stewardship in the intensive care unit / C. E. Luyt, N. Bréchot, J. L. Trouillet, J. Chastre // Critical Care. 2014. Vol. 18. Issue 5. P. 480–492.
51. Malanovic N., Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram—Positive Bacteria // Pharmaceuticals (Basel). 2016. Vol. 9. Issue 3. P. 59.
52. Mattick A. T., Hirsch A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci // Lancet. 1947. Vol. 250. No. 6462. P. 5–8.
53. 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. 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., Kim H. S., Kim S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions // Biochem Biophys Res Commun. 1998. Vol. 244. Issue 1. P. 253–257.

56. Petretto G. L., Cossu M., Alamanni M. C. Phenolic content, antioxidant and physico–chemical properties of Sardinian monofloral honeys // 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? // The Lancet infectious diseases. 2012. Vol. 12. No. 3. P. 249–253.
58. Rapaport D., Shai Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers // J Biol Chem. 1991. Vol. 266. No. 35. P. 23769–23775.
59. Read A. F., Woods R. J. Antibiotic resistance management // 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. Wheater, G. Sonse // European journal of oral sciences. 2008. Vol. 116. No. 5. P. 424–430.
61. Rozek A., Friedrich C. L., Hancock R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles // Biochemistry. 2000. Vol. 39. Issue 51. 15765–15774.
62. Rozek T., Wegener K. L., Bowie J. H., Oliver I. N., Carver J. A., Wallace J. C., Tyler M. J. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs Litoria aurea and Litoria raniformis // European Journal of Biochemistry. 2003. Vol 267. Issue 17. P. 5330–5341.
63. 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. 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 // Biopolymers. 2002. Vol. 66. Issue 4. P. 236–248.
66. 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., Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees // Apidologie. 2010. Vol. 41. No. 3. P. 295–311.

68. Sitaram N, Nagaraj R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity // // Biochim Biophys Acta. 1999. Vol. 1462. Issue 1–2. P. 29–54.

69. Fever in honeybee colonies / P. T. Starks, C. A. Blackie, D. Thomas, P. T. Seeley // Naturwissenschaften. 2000. No. 87. P. 229–231.

70. 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. Schittek // 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 // Pharmacy and Therapeutics. 2015. Vol. 40. No. 4. P. 277–283.

72. Viswanathan V. K. Off–label abuse of antibiotics by bacteria // Gut Microbes. 2014. Vol. 5. Issue 1. P. 3–4.

73. 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., Wencewicz T. A. Prospects for new antibiotics: a molecule–centered perspective // The Journal of antibiotics. 2014. Vol. 67. No. 1. P. 7.

75. Watanabe T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria // Bacteriological Reviews. 1963. Vol. 27. No. 1. P. 87.

76. Wilson C. L., Quellette A. J., Satchell D. P., Ayabe T., López—Boado Y. S.,

Stratman J. L., Hultgren S. J., Matrisian L. M., Parks W. C. Regulation of intestinal alpha–defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense // 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 // ACS Chem Biol. 2010. Vol. 5. No. 10. P. 905–917.

78. 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 // Nature 2002. No. 415. P. 389–395.

80. 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., Mah T-F. /Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm—Specific Resistance to Antibiotics // Journal of Bacteriology. 2008. Vol. 190. Issue 13. P. 4447–4452.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ 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
«05» ноября 2019 г.

Задание

По ВКР студента Тугучева Михаила Вячеславовича

Тема работы: «Сравнение методов выделения пептидов из мёда и перги».

Утверждена приказом по Университету от «30» ноября 2020 г. №904/о

Срок сдачи студентом законченной работы «28» мая 2021 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Подбор и изучение литературы, составление библиографии по теме научного исследования (магистерской диссертации)	Ноябрь 2019-февраль 2020	выполнено
2	Составление содержания магистерской диссертации, подготовка обзора литературы по теме магистерской диссертации.	Февраль 2020-апрель 2020	выполнено
3	Оформление теоретической части магистерской диссертации (1 главы), исправление замечаний	Апрель 2020-октябрь 2020	выполнено
4	Выбор материалов и методов исследования	Октябрь 2020	выполнено
5	Изучение ионообменной хроматографии как метода выделения пептидов из мёда и перги, выполнение экспериментальной части исследования	Ноябрь 2020 – декабрь 2020	выполнено
6	Изучение метода осаждения белков ТХУ и твердофазной экстракции как способа выделения пептидов из мёда и перги, выполнение экспериментальной части исследования	Декабрь 2020 – январь 2021	выполнено
7	Исследование применения метода ВЭЖХ для выделения и очистки пептидов мёда и перги, выполнение экспериментальной части исследования	Январь 2021 – февраль 2021	выполнено
8	Обработка полученных результатов, оформление таблиц, графиков, их описание.	Январь 2021-май 2021	выполнено
9	Подготовка материалов исследования для апробации на научно-практических конференциях	Май 2021-июнь 2021	выполнено
10	Оформление текста квалификационной работы. Подготовка доклада и презентации	Май 2021-июнь 2021	выполнено
11	Проверка работы магистерской диссертации на наличие заимствования в системе «Антиплагиат»	До 7 июня 2021	выполнено

Дата выдачи задания «05» ноября 2019 г.

Руководитель _____ Заплатин Б. П.

Руководитель _____ Карпова Г. А.

Задание принял к исполнению _____