

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

Факультет физико-математических
и естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ФРАКЦИИ ПЕПТИДОВ ПЕРГИ С МОЛЕКУЛЯНОЙ
МАССОЙ 5-10 кДА»**

Студент  Афанасьева Ангелина Александровна

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 хорошо (протокол заседания ГЭК от 19.06.17 № 1)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Биологические и физиологические свойства перги	7
1.2 Биохимический состав перги.....	13
1.3 Липиды (жиры) цветочной пыльцы (пчелиной обножки).....	17
1.2 Регуляторные пептиды и физиолого-биохимические аспекты их действия	27
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИ.....	28
2.1 Материал исследования	28
2.2 Методы исследования	28
2.2.1 Определение общего белка методом Лоури.....	28
2.2.2 Гель-фильтрация	29
2.2.3 Подготовка колонки для гель-фильтрации	30
2.2.4 Определение рабочего объёма колонки, калибровка колонки	30
2.2.5 Получение фракций пептидов методом гель-фильтрации	31
2.2.6 Определение молекулярной массы пептидов методом гель-фильтрации.....	32
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
3.1 Разработка метода получения пептидов перги	34
3.2 Результаты определения белков и пептидов методом Лоури	35
3.3 Результаты гель-фильтрации.....	40
ВЫВОДЫ.....	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Все более широкое применение продуктов пчеловодства в качестве лечебных и профилактических средств является характерной особенностью современной медицины[29,21]. Медоносная пчела - это прекрасный природный фармацевт, который существовал 56 млн. лет до появления первобытного человека. Ещё до научных исследований люди знали, что мед помогает сохранить бодрость и юность, поэтому использовали его и как продукт питания, а также как и лекарство. Мёд пчелиный — продукт, представленный собой частично переваренный в зобе медоносной пчелы нектар. Мед по своему составу является весьма сложным продуктом. Многие исследования показали, что мёд состоит из таких химических составляющих, как сахара вода, гидроксиметилфурфурол (ГМФ), флавоноиды, а также минералы и азотсодержащие вещества.

В настоящее время развитие современного пчеловодства позволило шире развернуть научную работу по изучению механизма действия продуктов, вырабатываемых медоносной пчелой, на организм человека и внедрению их в медицинскую практику. Появился термин «апитерапия». Пчелиная семья даёт человеку возможность получить целебные продукты: мед, воск, прополис, пчелиный хлеб (перга), маточное молочко, пчелиный яд, трутневый расплод (личиночное молочко), забрус, подмор, пыльцу и даже пчелиную огнёвку. Все эти пчелопродукты используются в различных отраслях промышленности, сельского хозяйства и медицине [5].

В долгой истории человечества перга считалась не только питательным веществом, но также и лекарством. Медицинское направление, называемое апитерапией, развилось в последние годы и сейчас предлагает способы лечения многих заболеваний с помощью перги и других продуктов пчеловодства.

В современном мире значительно увеличились знания о химическом

составе продуктов пчеловодства, механизмах их действия на организм человека и о возможностях применения их с лечебной целью при самых различных заболеваниях.

В настоящее время одним из самых перспективных направлений в фармакологии является создание биологически активных препаратов на основе биологически активных веществ природного происхождения. Такие препараты характеризуются высокой биологической активностью, менее выраженным побочным действием и высокой биодоступностью.

Ведется активный поиск новых источников природных пептидов, а также разрабатываются всё новые методы химического синтеза пептидных молекул для дальнейшего введения пептидных препаратов в производство.

На данный момент химический синтез новых биологически активных пептидов является весьма затратным и трудоемким процессом. В связи с этим, сейчас более активно ведется работа по выделению биологически активных пептидов из природных источников.

В данной работе особое внимание уделено пчелиной перге. Это уникальное хранилище витаминов и микроэлементов. Перга благотворно влияет на любые виды обмена: минеральный и углеводный, белковый и жировой. Перга оказывает цитотоксическое действие на злокачественно перерожденные клетки, обладает более выраженными антитоксическими свойствами. Она способствует повышению содержания в крови эритроцитов, ретикулоцитов и гемоглобина, обеспечивает нормализацию количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы. В состав перги входят биологически активные пептиды, влияющие на физиологические процессы и оказывающие положительный эффект на деятельность большинства регуляторных систем. Следует отметить, что препараты, на основе природных пептидов находят применение при лечении широкого спектра патологий. Они оказывают положительное влияние на физиологические функции организма, являются эндогенными факторами регуляции обменных процессов, то есть действуют по принципу «своих регуляторных

молекул», этим объясняется отсутствие побочных эффектов, мягкий модуляторный характер действия и высокая активность [16, 33].

Продукты пчеловодства являются перспективным источником биологически-активных веществ для биотехнологии и медицины. К настоящему времени из мёда, маточного молочка и гомогената личинок пчел выделено и охарактеризовано большое количество индивидуальных веществ, комбинации которых широко используются для создания БАДов и лекарственных препаратов. Совокупность свойств уже охарактеризованных веществ не может объяснить многообразие фармакологических эффектов продуктов пчеловодства в неочищенном виде. Мед, цветочная пыльца (обножка), маточное молочко, прополис - уникальные продукты природы, содержащие в сбалансированном сочетании ряд важнейших биологически активных компонентов: белков, липидов, аминокислот, витаминов, ферментов, макро- и микроэлементов. Обладая достаточно высокой терапевтической активностью, они действуют мягче, физиологичнее синтетических лекарственных средств, характеризуются высокой степенью безопасности, а относительная дешевизна делает их доступными практически для всех социальных слоев населения [39,41].

Данные исследований последних лет свидетельствуют о достаточно высоком содержании регуляторных пептидов, витаминов, минеральных веществ и даже гормонов в пыльце пчел, так называемой пчелиной обножке. Поскольку биологически активные пептиды влияют практически на все физиологические процессы и регулируют деятельность всех регуляторных систем, перспективным направлением является изучение пептидного спектра пчелопродуктов с целью создания новых лекарственных препаратов на их основе.

По своей калорийности и содержанию питательных веществ пыльца приравнивается к таким продуктам, как пшеничная мука. 20 г пыльцы соответствуют 1 кг мяса, но это в несчетное число раз более ценный

белковый продукт. Она является прекрасным лечебным и профилактическим средством при многих заболеваниях, а также биостимулятором, благотворно действующим на организм. Пыльца содержит все микроэлементы и аминокислоты, необходимые для нормального развития организма. Особенно много в ней калия, железа, меди и кобальта. Провитамина А (каротина) в пыльце в 20 раз больше, чем в моркови.

В ней есть витамины группы В, Е, С, D, Р, РР, К и др., фитогормоны, стимулирующие рост тканей, антибактериальные вещества, а также соединения, обладающие противосклеротическим, противовоспалительным, капилляроукрепляющим, антиоксидантным, мочегонным, желчегонным, противоопухолевым и другими свойствами.

240 полезных для организма человека веществ обнаружено в пыльце, в том числе ферменты, играющие важную роль в процессах обмена веществ и регулирующие важнейшие биохимические процессы. Пыльца различных растений отличается по своему составу, что сказывается на ее лечебно-профилактических свойствах.

В пыльце, собранной пчелами, и перге содержатся биологически активные вещества не только растительного, но и животного (пчелиного) происхождения. Этим объясняется их наиболее ярко выраженный терапевтический эффект по сравнению с настоями и отварами лекарственных трав.

Цель данной работы - выделение и изучение физико-химических свойств пептидов перги.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать способ получения экстракта перги;
2. Определить содержание общего белка методом Лоури;
3. Выделить пептидную фракцию перги методом геле-фильтрации

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологические и физиологические свойства перги

Перга представляет собой собранную и переработанную пчелами пыльцу различных растений. Перга представляет собой белковый корм, который очень важен для пчелиной семьи. Пергу заготавливают на пасеках, летом соты с пергой отбирают из ульев, а весной ставят обратно [6].

Перга – цветочная пыльца (пчелиный хлеб, хлебина), собранная пчёлами, обработанная их слюной, уложенная и утрамбованная в ячейки сотов на $\frac{2}{3}$ глубины. Вкус перги заметно отличается в зависимости от свежести и вида пыльцы, но часто напоминает поливитамины. В ячейках перга часто сложена слоями (разноцветными на вид), в зависимости от того, с каких растений в этот момент её собирали пчёлы. Сверху пчелы заливают пергу медом и покрывают «крышечкой» из воска и прополиса. В анаэробных условиях под действием ферментов, бактерий и дрожжей возрастает содержание молочной кислоты, которая консервирует смесь [1].

Роль перги для пчелиной семьи велика. Она является важной белковой пищей, комбинируемой в себе свойства меда, пыльцы и прополиса. При нехватке перги в улье, семья пчел перестает развиваться. У рабочих пчел уменьшается выделение воска, и как результат, - уменьшается строительство сотов. У пчел кормилиц уменьшается количество маточного молочка. А в результате этого матка получает меньше корма и начинает меньше откладывать яиц. Пчелы кормилицы смогут кормить меньшее количество личинок. А при полном отсутствии перги, пчелиная семья не выраживает засев. В нормальных условиях пчела развивается три недели, из которых три дня получает маточное молочко и ещё шесть – медово-перговую смесь, после чего она развивается в сильную и здоровую особь, не получая корма [14,15].

В сезон медосбора рабочие пчелы посещают огромное количество цветущих растений, собирая на свое тело большое количество пыльцы. После чего они счищают с себя пыльцу, смачивают нектаром и выделениями слюнных желез и формируют в корзиночках задних ножек комочки – обножки, которые затем утрамбовываются в ячейки сот. Такая пыльца сразу же теряет способность к прорастанию. Вес каждого комочка составляет от 8 до 15 мг, а в каждой ячейке содержится до 20 обножек = 140-180 мг. Ульевые пчелы утрамбовывают сложенные обножки, заливают медом и запечатывают сверху. Превращение такой смеси в пергу сопровождается биохимическими изменениями, в которых участвуют в основном три рода микроорганизмов – сахарные грибы, дрожжи, лактобациллы, молочнокислые бактерии и водородные бактерии [13]. Под их воздействием начинается молочнокислая ферментация, которая имеет четыре фазы микробиологической деятельности [10].

Первая фаза длится 12 часов и характеризуется развитием разных групп микроорганизмов, в том числе и дрожжей. Ферментация начинается с появления молочнокислых бактерий и дрожжей, а также некоторых аэробных бактерий.

Во второй фазе развиваются анаэробные молочнокислые бактерии – стрептококки, использующие при этом ростовые факторы, синтезируемые дрожжами и бактериями. В результате этого, повышается кислотность смеси обножки, и возрастает содержание витаминов группы В.

Третья фаза характеризуется исчезновением стрептококков и развитием лактобацилл, которые продуцируют больше молочной кислоты, чем стрептококки. В аэробных процессах бактерий и в разложении пыльцы особую роль играют водородные бактерии, которые через 2-3 дня исчезают.

Четвертая фаза начинается в конце 7 дня. При этом характерно исчезновение молочнокислых бактерий и дрожжей некоторых видов, так как высокая концентрация молочной кислоты подавляет их развитие.

Кислотность достигает 4 – 4,2 pH. Обножка в ячейках сот становится микробиологически стерильной с наличием дрожжей лишь некоторых видов. Молочнокислая ферментация перги заканчивается полностью через 15 дней.

В результате ряда биохимических превращений возникает структурное изменение, благодаря которому перга превосходит по качеству и своим полезным свойствам пыльцу. В перге содержится больше моносахаридов, витаминов, минеральных веществ и ферментов. Превосходит она и по пищевой и энергетической ценности, и усваиваемо

сти организмом человека, но немного уступает пыльце по количеству белков и жиров. Важно отметить, что при употреблении в пищу перги, прошедшей молочнокислое брожение, риск возникновения аллергических реакций значительно снижается, чем при употреблении цветочной пыльцы [11,13].

Входящая в состав перги аскорбиновая кислота (витамин С) играет фундаментальную роль в организме. В комплексе с опорным белком хондромукоидом она формирует внутриклеточное структурное вещество, необходимое при образовании соединительной ткани хряща, костей, зубов и при заживлении ран [11].

Разнообразная окраска пыльцевых зерен связана с наличием в их составе пыльцы и перги каротиноидов: альфа- и бета-каротина, ликопена, ксантофилла и зе-аксантина - предшественников ретинола (витамина А)[2].

Биотин (витамин Н) входит в состав пыльцы и состав перги активного центра ряда ферментов метаболизма жирных кислот, углеводов и аминокислот. Недостаточность биотина со временем приводит к пластинчатому шелушащемуся дерматиту, астении и депрессии. Необходимое взрослому человеку количество витамина Н (50 мкг) содержится в 50 г пчелиной обножки, печени, почек, 200 г яиц, 250 г гороха. Кроме поступающего с пищей, часть необходимого организму биотина синтезируется кишечной микрофлорой [10].

Токоферолы (витамин Е) выполняют в живых тканях роль биологических антиоксидантов, препятствующих развитию перекисного окисления ненасыщенных липидов клеточных мембран. Он улучшает использование белка организмом, способствует усвоению жиров, каротиноидов и витамина Е. Токоферол влияет на функцию эндокринных желез, защищая производимые ими гормоны от окисления, повышает устойчивость эритроцитов к гемолизу. Относительная недостаточность витамина может возникать при избыточном поступлении с пищей полиненасыщенных жирных кислот. Для нормальной жизнедеятельности организму ежедневно требуется около 15 мг токоферолов, и данную потребность восполняют 20 г пчелиной обножки, 15 г соевого масла или 35 г подсолнечного [7].

Никотиновая кислота (витамин В3 или РР, ниацин) работает на ранних стадиях биологического окисления огромного числа соединений, оказывает регулирующее влияние на высшую нервную деятельность. Она может синтезироваться в организме человека: для синтеза 1 мг ниацина требуется 60 мг триптофана. Дефицит витамина может быть связан с преобладанием в рационе кукурузы, бедной никотиновой кислотой и триптофаном, или злаковых, где он содержится в связанной, почти неусвояемой форме. Для профилактики недостаточности необходимо потреблять около 20 мг витамина в сутки, что эквивалентно 100-150 г пчелиной обножки или пекарских дрожжей, 200 г печени, 200-250 г птицы или арахиса.

Фолиевая кислота (витамин В9), содержащаяся в составе перги и составе пыльцы играет важнейшую роль в обмене ряда аминокислот и синтезе нуклеиновых кислот. Поэтому при ее недостаточности страдают прежде всего ткани с высокой скоростью деления клеток - кроветворная и слизистая кишечника. Суточная доза витамина (0,4 мг) содержится в 60-100 г пчелиной обножки.

Пантотеновая кислота (витамин В5) участвует в ферментативном окислении и биосинтезе жирных кислот, триглицеридов и фосфолипидов, холестерина и гормонов коры надпочечников; в биосинтезе ацетилхолина и ряда других соединений. Частично необходимая человеку кислота продуцируется кишечной микрофлорой. Кишечные инфекции, нарушающие микробный синтез витамина и его всасывание, применение многих антибиотиков и сульфаниламидов, недостаток витаминов С и фолиевой кислоты снижают обеспеченность организма пантотеновой кислотой. Потребление 100 г пчелиной обножки или пекарских дрожжей, 70 г печени или 200 г овса удовлетворяет ежедневную потребность в витамине [7,10,11].

В перге и пыльце обнаружено высокое содержание фенольных соединений, обладающих многообразной биологической активностью, - флавоноидов. Кроме каротиноидов и биофлавоноидов пыльца и перга содержит хлорогеновые и тритерпеновые кислоты, а также гормоноподобные вещества, сходные с ауксинами - регуляторами роста растений [1,20].

Перга, как продукт, богатый полноценными белками, незаменимыми аминокислотами и жирными кислотами, углеводами, витаминами, другими биологически активными веществами, благотворно воздействует и на организм человека. Она повышает иммунобиологические свойства, улучшает адаптационные способности организма, способствует уменьшению утомляемости, играет важную роль в диетическом питании. Пергу используют при лечении колитов, хронических метеоризмов, гепатитов. Хороший лечебный эффект оказывает применение смеси перги с медом при заболеваниях нервной системы, анемии [31].

Перга практически полностью усваивается организмом. При употреблении перги в пищу следует аккуратно относиться к дозировке, так это не просто лакомство, а природная, биологически-активная добавка [31].

Перга является готовым сбалансированным и, что особенно важно, легкоусвояемым пчелиным продуктом. По активности и наличию полезных веществ она в несколько раз превосходит пыльцу. Да и не только пыльцу превосходит перга пчелиная, по богатству состава ее нельзя сравнить ни с одним другим продуктом, существующим в природе. Хотя, состав пчелиного хлеба нередко отличается, поскольку производится из нектара совершенно разных растений, определенный набор веществ, присущий ей, остается неизменным. Прежде всего, к таким веществам относятся:

- Макро- и микроэлементы – кремний, кобальт, медь, фосфор, йод, магний, бор, кремний, кальций, хром и калий.
- Практически все витамины.
- Гормоноподобные вещества.
- Ферменты. Свойства перги
- Моносахариды.
- Аминокислоты – глицин, метионин, аргинин, гистидин, лизин, тирозин, фенилаланин, пролин, изолейцин, валин, треонин, серин, аланин, лейцин, аспарагиновая и глутаминовая кислота.
- Жирные кислоты – арахидоновая, клупанодоновая, эруковая, гадолеиновая, линоленовая, липоевая, олеиновая, стеариновая, пальмитолеиновая, пальмитиновая, миристиновая, лауриновая.
- Белки, углеводы и жиры.

Для более широкого использования такого уникального натурального продукта требуются детальные научные биохимические и физиологические исследования.

1.2 Биохимический состав перги

В научных изданиях публикуются сведения о составе перги, не редко отличные друг от друга, при этом каждый источник заслуживает доверия.

Объяснение этому достаточно простое: перга не является однородным по составу продуктом. Тот, кто наблюдал пчёл у летка, видел, что обножка у всех пчёл разного цвета, т.е. пыльца собрана с разных растений. Эти и многие другие факторы влияют на различия состава пыльцы одинаковых растений, а ведь пчела может улететь и за три километра. Исключение, если пасека стоит в огромном массиве культурных посевов, например, гречишном поле. Можно предположить, что как бы ни была важна пыльца определённого растения, всё же в ней может быть меньше того или иного вещества, поэтому предпочтительней полифлорный или разнотравный сбор.

Перга содержит аминокислоты, витамины и ферменты, обладающие биологической ценностью для пчёл.

Часть обножки используется сразу молодыми пчёлами, которые продуцируют личиночный корм. Другую часть пчёлы-сборщицы складывают в ячейки, расположенные сверху и сбоку расплода. Как правило, пчёлы заполняют обножкой ячейки на 0,4—0,8 глубины. После этого пчёлы начинают консервировать пыльцу; получается конечный продукт этого процесса — перга. В результате создаётся существенный резерв ценного белкового корма, крайне необходимого пчёлам в весенний период.

Перга, в отличие от пыльцы, стерильна, поэтому она лучше усваивается и переваривается личинками пчёл. Её питательная ценность в 3 раза выше пыльцы и в 9 раз выше любого другого заменителя пыльцы. По своим антибиотическим свойствам перга в 3 раза превосходит пыльцу [34].

Как известно, перга может храниться долгое время, такая перга правильно собрана, обработана и соответствует установленным критериям. Согласно ТУ 10 РФ 505-92 "Перга сушеная" имеет следующие физико-химические показатели:

Таблица 1.

Физико-химические показатели «Перги сушеной»

Показатели	Нормы
Внешний вид	Мелкие неравномерные комочки
Вкус	Кисло-сладкий, слегка горьковатый
Запах	Характерный медово-пыльцовый
Консистенция	Мягкорыхлые, легко распадающиеся комочки
Цвет	От тёмно-желтоватого до коричнево-зеленого и розового
Концентрация водородных ионов (рН) 2-%-го водного раствора перги, не менее	3,7
Массовая доля влаги, %, не более	15
Массовая доля воска, %, не более	5
Массовая доля механических примесей, %, не более	0,1
Массовая доля сырого протеина, %, не менее	20
Массовая доля флавоноидных соединений, %, не менее	2,3
Окисляемость, с, не более	2,0
Поражённость плесенью	не допускается

В перге содержится до 35% углеводов, выявлено больше восстанавливающих углеводов, чем в обножке. Это происходит в результате добавления нектара и меда во время формирования обножки и перги.

Количество липидов в перге медоносных растений различных видов колеблется в значительных пределах – от 1 до 6% [13].

По одним источникам установлено, что перга содержит 16 аминокислот и 13 жирных кислот, а по другим, что она содержит все незаменимые аминокислоты [10,24.].

Аминокислоты: глютаминовая - 24,3 г/кг, аспарагиновая - 29,92г/кг, лейцин - 18,70г/кг, аланин - 12,69г/кг, серин - 13,31г/кг, глицин - 11,13г/кг, треонин - 11,49г/кг, валин - 13,49г/кг, изолейцин - 10,59г/кг, пролин - 9,04г/кг, фенилаланин - 11,41г/кг, тирозин - 12,98г/кг, лизин - 3,89г/кг, гистидин - 12,21г/кг, аргинин - 6,61г/кг, метионин - 2,02 г/кг.

Жирные кислоты: лауриновая 0,27 г/кг, миристиновая - 0,41г/кг, миристолеиновая - 15,1г/кг, пальмитиновая - 35,92г/кг, пальмитолеиновая - 14,36г/кг, стеариновая - 0,93г/кг, олеиновая - 5,14г/кг, линолевая - 8,11г/кг, линоленовая - 28,96г/кг, гадолеиновая - 0,47г/кг, арахидоновая - 4,08г/кг, эруковая - 1,97г/кг, клупинодоновая - 3,17 г/кг.

Аминокислоты и жирные кислоты, которые входят в состав перги, усваиваются организмом пчелы, практически, без количественных и качественных потерь.

Также в своем составе перга содержит все известные витамины. Так, витамина С 140—205 мг%, В1 — 0,4-1,5 мг%, В2 — 0,54-1,9 мг%, В6 — 0,5-0,9 мг%, Р — 60 мг%, А — 50 мг%, Е — 170 мг%, Д — 0,2-0,6 мг%. Минеральные соли в перге составляют 4-7 мг%, органические кислоты — 1-5 мг%. Макро- и микроэлементы содержатся в количестве: К (40%), Mg (25%), Fe (17%), Са (17%)и др. Гормоноподобные вещества, в том числе стимулятор роста (гетероауксин). Также в ней содержатся: Со-кобальт, Си-медь, Zn-цинк, Р-фосфор, Mn-марганец, Cr-хром, J-йод и др. [44,45].

Химический состав перги и обножки позволяет сказать, что это уникальные и не мало важные продукты, как для пчелиной семьи, так и для человека. Но чем шире спектр веществ, тем шире поле для его дальнейшего изучения. Выделение пептидов перги, подробное изучение состава и биологических свойств — это одно из перспективных направлений в данной области.

1.3 Липиды (жиры) цветочной пыльцы (пчелиной обножки)

В пчелиной обножке содержится большое количество веществ липидной природы. К ним относят различные жирные кислоты, кетоны, стеролы, фосфолипиды, а так же углеводороды и фитостерины. Объем всех этих липидных компонентов обычно не превосходит 5-6% общего объема обножки.

Существует две группы жирных кислот: насыщенные и ненасыщенные. Частным подвидом ненасыщенных кислот являются полиненасыщенные. Они имеют наивысшее биологическое значение, так как принимают участие в регенерации клеток. Как и аминокислоты, жирные кислоты бывают заменимыми и незаменимыми. Заменимые могут синтезироваться в организме. Их предшественниками являются углеводы, реже белки. Незаменимые, в свою очередь, синтезироваться не могут и должны поступать в организм из вне. К ним относят: линолевую, линоленовую и арахидоновую кислоты.

В составе пчелиной обножки так же имеются жирные кислоты: пальмитиновая, линолевая, линоленовая, стеариновая, декановая, лауриновая, эйкозановая, олеиновая, бегеновая, гептадекановая. [36]

В общей сумме незаменимые полиненасыщенные кислоты обычно составляют примерно 50% от общего количества жирных кислот содержащихся в пчелиной обножке. Полиненасыщенные жирные кислоты принимают участие в построении клеточных мембран (оболочек) в организме; они также являются предшественниками гормоноподобных веществ - простагландинов. Простагландины являются участниками в процессе регулирования обмена веществ клетки, кровяного давления и агрегации тромбоцитов. Они способствуют понижению уровня холестерина, что влечет за собой его быстрое преобразование в фолиевые кислоты и выведению их из организма. Это благоприятно воздействует на

структуру кожи и волосяного покрова; при этом снижается артериальное давление и уменьшается риск образования тромбов. При условии отсутствия незаменимых жирных кислот останавливается развитие организма, и возникают тяжёлые заболевания.

Так как фосфолипиды могут синтезироваться в самом организме, они не считаются незаменимыми пищевыми веществами. Помимо глицерина и жирных кислот в их состав входит также фосфорная кислота. Одними из важнейших компонентов внутриклеточных структур и мембран клеток являются эти жироподобные вещества. Роль фосфолипидов заключается не только в этом. Фосфолипиды способствуют процессу переваривания, всасывания и обмена жиров. Помимо этого они снижают содержание жира в крови и способствуют выведению липидов из печени, препятствуя ее жировому перерождению. Особенно необходимо поступление достаточного количества фосфолипидов с приемом пищи при атеросклерозе, потому как именно лецитин имеет свойство нормализации обмена холестерина.

Терпены являются природными углеводородами с общей формулой $(C_5H_8)_n$, где $n=2, 3, 4, \dots$. Они имеют широкое распространение в природе (чаще в растительном и реже в животном организме). Терпены относятся к изопреноидам. Это обширный класс природных соединений. Они были обнаружены практически во всех тканях растений. Их содержание было наблюдалось и в различных эфирных маслах, смолах, скипидаре и бальзамах. Изопреноиды были обнаружены в продуктах жизнедеятельности различных бактерий и грибов, а также и в секреторных выделениях у насекомых. Эфирные масла очень богаты терпенами и их производными -терпеноидами .

Терпены классифицируются по числу изопреновых групп (C_5H_8) содержащихся в данной молекуле. По этой классификации терпены подразделяются на монотерпены $C_{10}H_{16}$ (обычно их называют просто

терпены), сесквитерпены (их называют полутерпены) $C_{15}H_{24}$, дитерпены $C_{20}H_{32}$, тритерпены $C_{30}H_{48}$ или $(C_{10}H_{16})_3$, и т. д.

К тритерпеновым кислотам относятся урсоловая, олеаноловая и помоловая. Они имеют широкий спектр фармакологических действий и препятствуют нарушению коронарного кровообращения, гипотонии, развитию аритмии, облегчают боли в сердце, стимулируют кровообращение венечных сосудов и сосудов головного мозга, повышают восприимчивость сердечной мышцы к воздействию сердечных гликозидов и т.д. Гликозиды содержатся в боярышнике, малине, рябине и др.[40].

Урсоловая кислота имеет ранозаживляющее свойство. Она влияет на повышение умственной и физической работоспособности, способствует улучшению пищеварения и нормализации обмена веществ. Урсоловая и олеаноловая кислоты демонстрируют заметное ингибирующее свойство против развития опухолей, которое по мощности сравнимо с воздействием известного ингибитора опухолей - ретиноевой кислоты. Известно также и о гепатопротекторной, кардиостимулирующей, гиполипидемической и противоатеросклеротической активности урсоловой и олеаноловой кислот.

Физиологическая активность урсоловой кислоты проявляется при наружном и внутреннем применении. Антимикробные, противовоспалительные и противоопухолевые свойства данной кислоты позволяют использовать ее в косметических продуктах. Она эффективно успокаивает чувствительную и покрасневшую кожу, сохраняет упругость кожи, обладает омолаживающим эффектом, восстанавливает эластичность стареющей кожи. Урсоловая кислота и ее изомер-олеаноловая кислота, сопутствует ей в большинстве растений. Данные кислоты были рекомендованы для проведения терапии и профилактики рака кожи в нескольких странах. Эти тритерпеновые соединения стимулируют рост волос посредством периферического тока крови в кожном покрове головы и активизации материнских клеток волос. С помощью обработки кожи

препаратами содержащими эти соединения, можно препятствовать выпадению волос и возникновению перхоти.

Каротиноиды (лат. *carota* – морковь, греч. *eidos* - вид) это природные пигменты имеющие цвет от желтого до красно-оранжевого, синтезирующиеся бактериями, грибами, высшими растениями, водорослями, губками, кораллами и другими организмами. Они также обуславливают окрас цветка, плода и являются тетратерпенами. Существует подразделение на 2 группы: 1 группа – это каротиноидные углеводороды (или по-другому каротины. Например, α -каротин, β -каротин, γ -каротин, ϵ -каротин, ликонин и т.д.) 2 группа - это ксантофилы. Каротины являются чистыми углеводородами, поскольку состоят только из атомов углерода и водорода. Ксантофилами называются окисленные каротины, так как содержат атомы кислорода.

Каротиноиды способствуют повышению иммунного статуса и защищают от фотодерматозов. Предшествуя витамину А, они играют важную роль в улучшении зрения; к тому же, это природные антиоксиданты. Каротиноиды используются в качестве пищевых красителей в промышленности, как компоненты витаминного корма для животных, а в медицине для лечения пораженной кожи.

Растительные стероиды – фитостерины входят в состав цветочной пыльцы. Фитостерины являются стеринами растительного происхождения и структурно похожи на холестерин. Они обладают антисклеротическим, онкопрофилактическим, антиоксидантным и иммуностимулирующим свойством. Фитостерины имеют компенсаторную функцию при гормональном дисбалансе в организме, имеют благоприятное воздействие на организм в период климакса у женщин и при сниженном показателе тестостерона у мужчин. Фитостерины тормозят всасывание холестерина в кишечнике, тем самым уменьшая проявления атеросклероза, снижают уровень холестерина в крови и уровень липопротеидов низкой плотности, так называемых «плохих липидов»[46].

Научно доказано, что употребление фитостеринов вместе с пищей снижает риск возникновения ишемической болезни сердца примерно на 20-25%. Доказано и наличие онкопрофилактического эффекта у фитостеринов: их употребление в достаточном количестве существенно снижает риск возникновения рака толстой кишки, молочной железы, желудка, легких, простаты. В организм фитостерины могут попасть вместе с растительной пищей. Пищевыми продуктами, богатыми фитостеринами, можно назвать орехи и зелень. В современном рационе человека данные продукты ограничены, поэтому и присутствует недостаток фитостеринов, что ведет ко многим проблемам со здоровьем.

Хронический дефицит фитостеринов в рационе широко распространен в России. Пыльца имеет высокое содержание фитостеринов (примерно 0,6-1,6%). Например, в соевом масле содержится около 0,3% фитостеринов, что считается весьма высоким процентным показателем. В то же время, сухой экстракт корня крапивы имеет в своем составе не менее 0,8% фитостеринов (пересчитывая на β -ситостерол).

β -ситостерол является одним из самых распространенных фитостеролов или так называемых растительных стероидов. Это растительный аналог холестерина в организме; задерживают всасывание холестерина в кишечнике, широко применяется при атеросклерозе.

Растительные фенольные соединения весьма распространены как биологически активные вещества растений. Их исследования ведутся более чем 100 лет. Из состава растений было выделено несколько тысяч разновидностей фенолов и этот список пополняется. Фенольные соединения формируют разнообразный и большой класс органических соединений. В отличие от очень ядовитого вещества фенола (карболовая кислота), фенольные соединения растений малотоксичны и к тому же очень полезны. Производными фенола являются дубильные вещества, флавоноиды, кумарины и их гликозиды, и прочие вещества.

Флавоноиды являются фенольными соединениями с 2-мя ароматическими кольцами. Их можно встретить в свободном состоянии и в виде гликозидов, которые являются растительными пигментами. Флавоноиды включают несколько групп: катехины, антоцианы, флавоны, флавонолы, в зависимости от структуры [17].

Животные не имеют способности синтезировать соединения из флавоноидной группы. Считается, что флавоноиды (как другие растительные фенолы) это незаменимые компоненты пищи для человека и других видов млекопитающих [32].

Влияние флавоноидов на организм человека, как компонентов лекарственных растений было изучено на порядок лучше, чем их функционирование в растениях. Начало было положено Сент-Дьердьи вместе с группой ученых, которые в 1936 году выделили чистый витамин С из паприки - венгерского перца. Наряду с витамином С было выделено вещество, обладающее способностью уменьшить симптомы авитаминоза С, которое получило название витамин Р (paprica – перец; permeability – проницаемость). Как оказалось, этот витамин способен уменьшить степень проницаемости стенок капилляров и уменьшить хрупкость сосудов.

Основной функцией флавоноидов на сегодняшний день обозначается антиоксидантная. Растительного сырья, содержащего флавоноиды, имеет широкий диапазон лечебных свойств, а не только лишь антиоксидантные свойства. Большая часть флавоноидов сокращают степень хрупкости капилляров и усиливают воздействие аскорбиновой кислоты. Витамин Р не позволяет аскорбиновой кислоте окислиться. Витамин С и витамин Р имеют очень тесное взаимодействие. Витамин Р даже часто называют витамином С₂. Флавоноиды также предохраняют и такое вещество как адреналин от окислительного процесса – это один из главных гормонов организма. Флавоноиды также могут быть использованы как противовоспалительное, противоязвенное, гипотензивное, радиопротекторное и другие средства в зависимости от их структуры.

Некоторые виды флавоноидов обладают также и кровоостанавливающими свойствами, могут применяться при лечении геморроя; являются отличными желчегонными и диуретическими средствами, и в дополнение, оказывают гипотензивное и седативное действие. Помимо этого, флавоноиды благоприятно воздействуют на сердце, желудок, предупреждают спазмы, не позволяют развиваться аллергии, принимают участие в регуляции функции желез внутренней секреции. В последнее время появилась информация о противоопухолевом свойстве флавоноидов. При этом, они способствуют поддержанию состояния коллагена на высоком уровне и препятствуют образованию гематом, поскольку эластичность стенок сосудов зависимо от качества содержащегося коллагена. Данное свойство и было выявлено в первую очередь.

Хлорогеновые (оксикоричные) кислоты относят к фенольным соединениям, обладающим только одним ароматическим кольцом. Оксикоричные кислоты имеются почти у всех высших растений. Более широкое распространение получила кофейная кислота. Данная кислота чаще всего образует димеры с алициклическими кислотами, такими как хинная и шикимовая. Более известными являются 3-кофеил-хинная кислота (хлорогеновая) с ее изомерами. Биологическое действие большинства оксикоричных кислот была изучена на недостаточном уровне. Обнаружено выраженное желчегонное действие у феруловой, кофейной, хлорогеновой кислот и в особенности у цинарина.

Нуклеиновые кислоты (такие как ДНК и РНК) являются биологическими полимерными молекулами, хранящими в себе информацию об отдельном организме, определяющими его рост, развитие и наследственные признаки, передающиеся следующему поколению. Нуклеиновые кислоты содержатся в ядрах клеток у всех растительных и животных организмов. Этот факт и определил их название (лат. Nucleus-ядро). У нуклеиновых кислот растений имеются те же принципы строения, что и у нуклеиновых кислот животных организмов. Нуклеиновые кислоты

принимают участие в хранении генетической информации (ДНК) и передаче информации при процессе синтеза белков (РНК). Различные дисфункции организма и многие болезни вызываются изменениями структуры клеток и тканей, обусловленные нарушением синтеза белка. Потому как информация о синтезе белка реализуется от ДНК и РНК, сбой нуклеинового обмена или недостаток нуклеиновых кислот являются причинами различных патологических процессов. Особенно чувствительными к недостатку нуклеотидов являются ткани, которые имеют высокую скорость обновления (например, костный мозг, иммунитет и различные слизистые оболочки).

Сообщения о способности нуклеиновых кислот повысить общую сопротивляемость организма появились еще в 1892 г. Нуклеиновая кислота также использовалась для лечения тяжелых заболеваний с конца XIX века. Еще до открытия антибиотиков препараты с нуклеиновой кислотой с успехом применялись при лечении инфекционных заболеваний, опасных для жизни: холера, сибирская язва, стафилококковая и стрептококковая инфекции, дифтерия и др.

В наше время было обнаружено, что нуклеиновые кислоты являются одним из важнейших компонентов интегрального и иммунологического гомеостаза в организме. Были доказаны следующие свойства нуклеиновых кислот: радиозащитное, иммуномодулирующие (выработка устойчивости организма к различным инфекционным заболеваниям), способность улучшить клеточный состав крови, повысить содержание гемоглобина, понизить возбудимость нервной системы, увеличить мышечную силу. Важную роль нуклеиновых кислот в жизнедеятельности человека подчеркивает и факт торможения иммунной системы у лиц, исключивших их из рациона питания, даже сохраняя достаточную калорийность продуктов.

Содержание гормонов в пыльце впервые было выявлено при проведении опытов на мышах. Если кормить мышей только пыльцой и

водой, то особи женского пола развиваются нормально, а особи мужского пола отстают в развитии. Особенно недоразвитыми остаются семенные пузырьки, селезенка и зубная железа. Доул в своих опытах отмечал, что самки мышей, получавшие в корме от 1 до 5% пыльцы давали приплод на 40-80% больше, чем контрольная группа, не получавшая пыльцы.

Все это указывает на то, что пыльца содержит в себе женские гормоны, подобные эстрогенам (женские половые гормоны) человека. Их наличие было установлено однозначно. Содержащиеся в пыльце гормоны оказывают благоприятное влияние не только на половые функции мужчины и женщины, но и на общее состояние, работоспособность организма, душевное состояние и работу сердечно-сосудистой системы [32].

В опытах с растениями, которые проводили в первую очередь ученые Ларсен и Танг (1950), в эфирной вытяжке пыльцы были обнаружены три вещества, оказывающие влияние на рост. Кислое из этих трех веществ стимулирует прорастание овса, одно из нейтральных также стимулирует рост растений, в то время как второе нейтральное вещество препятствует росту. Если все три соединены вместе, то силы роста преобладают и регулируются веществом, препятствующим росту.

Шовен и некоторые японские ученые проводили подобные опыты на мышах и крысах. Если рацион мышей состоял на 50% из экстракта пыльцы, то увеличение веса по сравнению с контрольной группой, не получавшей пыльцы, составляло при употреблении пыльцы клевера 16%, одуванчика 37%, а фруктовой пыльцы даже 46%. Японцы в своих опытах ежедневно скармливали крысам от 0,1 до 0,5 г рапсовой пыльцы, что приводило через 30 дней к увеличению веса от 2,8 до 4,9%. Это удивительное действие может быть объяснено не только наличием стимулирующих рост веществ, но и другого вещества, о существовании которого Шовен высказывал предположения уже в 1968 г. Он (подобно

фактору усвоения сахара в меде) приводит к тому, что пища лучше усваивается.

У человека едва ли можно ожидать настолько явно выраженного воздействия пыльцы на рост и прибавку веса. Эти вещества в большей мере способствуют повышению жизнеспособности организма [8,32].

В 1906 году Уайт установил, что в цветочной пыльце содержится мало возбудителей болезней, поскольку в ее составе имеется натуральный антибиотик. Шовен и Луво (1952) утверждают, что он подавляет рост бактерий в кишечнике мышей, в кале которых, обычно очень богатом бактериями, при кормлении пыльцой количество возбудителей заметно снижается.

В 1956 г. Шонен и Луво установили, что не всякий вид цветочной пыльцы обладает хорошим антибиотическим действием [19].

В пчелиной обножке содержатся: глюкоза, фруктоза, сахароза, арабиноза, галактоза, ксилоза, раффиноза, стахиоза, декстрины, крахмал и целлюлоза. Преобладают глюкоза и фруктоза, попадающие в нее с нектаром и медом. Относительная доля клетчатки невелика (1-3%), крахмала обычно содержится около 2%.

1.5 Регуляторные пептиды и физиолого-биохимические аспекты их действия

Регуляторные пептиды – полифункциональная группа биологически активных веществ, играющие важную роль биорегуляторов в организме [30,37,38,42]. Они широко представлены в центральной и периферической нервной системе, и в некоторых биологических жидкостях организма и периферических органов. В эту категорию включают малые и средние по размеру пептиды от 2 до 50-60 аминокислотных остатков. Это деление условно, так как большое число регуляторных пептидов превышают обозначенные границы. Регуляторные пептиды образуются в результате

протеолиза больших пептидов-предшественников [3].

Регуляторные пептиды служат основой межклеточных взаимодействий и образуют самостоятельные пути, выступая в роли нейротрансмиттеров и нейрогормонов, а также могут служить нейромодуляторами, сосуществуя с «классическими» медиаторами и модулируя их активность. Регуляторные пептиды - универсальные химические регуляторы от влияния на функции отдельных групп клеток до управления работой целых систем и органов, включая сложные акты поведения [8].

Для регуляторных пептидов характерна тонкая координация многочисленных физиологических параметров. Каждый регуляторный пептид участвует в контроле нескольких биохимических и физиологических функций. С одной стороны, каждый из пептидов обладает определенными сочетаниями эффектов, с другой стороны, имеет перекрывающийся с остальными спектр биоактивностей. Это придает системе надежность функционирования и обеспечивает плавный и непрерывный переход от одного комплекса воздействий на функции организма к другому [3].

Регуляторные пептиды принимают участие в регуляции таких процессов, как память, обучение, сон, поведение, регуляция аппетита, жажды, дыхания, мышечный тонус, ощущение боли, стресс-реакции и др. Кроме этого пептиды имеют еще одну важную функцию – образование каскадных путей индуцированных воздействий [3]. В среднем каждый регуляторный пептид контролирует выход от 3 до 8-10 других регуляторных пептидов. Уровни воздействия касаются как синтеза и высвобождения, так и процессов деградации пептидов. Каждый индуцированный регуляторный пептид может модулировать ряд других регуляторных пептидов. В результате формируется цепной каскадный процесс, степень убывания которого определяется на каждом шаге индукции концентрационным порогом пептида, необходимым для

продолжения его стимулирующих и ингибирующих воздействий.

Термин «эндогенные регуляторные олигопептиды» означает, что молекулы РП являются результатом природного биологического синтеза и участвуют в регуляции функции того организма, в котором они созданы. Однако, существуют и «экзогенные» РП. Они обладают как неприродной, так и природной химической структурой и могут вводиться естественным или искусственным путем в другой организм того же или иного биологического вида. Примером могут служить альфа- и бета-казоморфины молока, фрагменты каротина, гемоглобина и другие. Уже выявлено свыше 9000 олигопептидов, более чем у 1000 различных видов живых организмов. Среди них нейропептиды представляют самый большой класс, насчитывающий более 1300 природных структур. К настоящему времени за один год выявляется около 500 новых пептидных структур.

В настоящее время выделяют около 40 семейств нейропептидов [3]. Понятие нейропептиды ввел в 1969 году голландский исследователь Д. Де Вид. Большой вклад внесли в изучение роли нейропептидов Р. Гиймен и Э.Шали. Они показали, что гипоталамус реагирует активность гипофиза путем выделения в малых количествах рилизинг-факторов пептидной природы, а также определили последовательность аминокислотных остатков в некоторых гормонах гипоталамуса (окситоцине, вазопрессине).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Материалом исследований являлись пептидные фракции, выделенные после гель-фильтрации 10% экстракта перги и непосредственно сам 10% экстракт перги.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение общего белка методом Лоури

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури. Метод основан на способности белка окрашиваться раствором Фолина. Метод Лоури характеризуется высокой чувствительностью. Интенсивность окраски комплекса измерялась при длине волны 750 нм, на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали БСА [43].

Реактивы: В₁-4% раствор Na₂CO₃ ; В₂-0,1 н раствор NaOH; А₁-2% раствор тартрата натрия; А₂-1% раствор CuSO₄; 1 н раствор реактива Фолина; раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) – 100 мкг/мл.

0,5 мл раствора препарата, содержащего 0,025-0,250 мг испытуемого белка, помещали в пробирку, прибавляли 2 мл реактива С (смешивали реактивы В₁ :В₂: А₁: А₂ в соотношении 50:50:1:1), встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем прибавляли 0,5 мл реактива Фолина, перемешивали и через 30-40 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 750 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против контроля (в качестве холостой пробы использовали дистиллированную воду). В качестве раствора сравнения используют смесь этих же реактивов без препарата. Концентрацию пептидов

определяли по калибровочному графику, построенному по БСА.

Из стандартного раствора БСА готовили разведения по схеме, приведенной в таблице 2.

Таблица 2.

Разведения для построения калибровочного графика БСА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
БСА	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
H ₂ O	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1

2.2.2 Гель-фильтрация

Низкомолекулярные вещества из белкового раствора можно удалить быстро и качественно с помощью метода гель-фильтрации. Хроматографическую колонку заполняем гелем, набухшим в воде или буферном растворе. Разделение веществ основано на различии размеров молекул, крупные молекулы не проникают в поры гранул геля и выходят из колонки первыми, а небольшие молекулы – через поры попадают в гранулы, а после чего задерживаются на колоке и движутся с меньшей скоростью. Метод гель-фильтрации часто называют разделением веществ молекулярного сита.

Наиболее часто для гель-фильтрации применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой: например, гели полисахарида декстрана (сефадексы).

При гель-фильтрации происходит фракционирование исходной смеси молекул на зоны в зависимости от размеров молекул. Зоны выходят из колонки в порядке убывания этих размеров.

2.2.3 Подготовка колонки для гель-фильтрации

Подготовка геля: Sephadex G-25 суспендировали в 5-10 кратном объеме дистиллированной воды и оставляли для набухания на 3 часа. Затем перемешивали и давали отстояться. После оседания основной массы

геля осторожно декантировали надосадочную жидкость с неосевшими обломками гранул. Суспендирование и последующую декантацию повторяли 3-4 раза, отмучивание геля уменьшает сопротивление колонки потоку растворителя, что приводит к увеличению скорости элюции.

Заполнение колонки: Колонку объемом 25 мл закрепляли в вертикальном положении, закрывали нижний конец пробкой со вставленным фитингом, поместили в основание колонки кружок фильтровальной бумаги, размер которого точно соответствовал внутреннему размеру колонки. Залили около 2 мл 0,9% раствора NaCl, дали заполниться фитингу и через воронку по стенке залили густую суспензию геля. Открыли зажим колонки и дали раствору свободно вытекать, следя за тем, чтобы столбик геля находился над слоем раствора. Суспензию геля прибавляли до тех пор, пока его высота в колонке не достигла нужного уровня. Затем на поверхность геля поместили кружок фильтровальной бумаги. Колонку промыли (уравновесили) 1 объемом 0,9% раствора NaCl.

2.2.4 Определение рабочего объёма колонки, калибровка колонки

На колонку наносили 0,5 мл раствора голубого декстрана и рибофлавина. Затем заполняли колонку раствором NaCl и подсоединяли к сосуду, из которого поступал элюирующий раствор. С момента нанесения образца на колонку собирали фракции объемом 1 мл. Элюирование проводили до полного выхода рибофлавина. Для определения элюионого объема рибофлавина и голубого декстрана измеряли оптическую плотность элюата на КФК-2 при длине 440 нм для рибофлавина и 750 нм для голубого декстрана. Складывали объемы всех фракций вышедших до максимума поглощения при 750 нм и находили свободный объем колонки ($V_{св}$). Внутренний объем колонки находили как разность между объемом элюции рибофлавина и свободным объемом.

$$V_{\text{внутр}} = V_{\text{эл рибофлавина}} - V_{\text{св}}$$

Таблица 3

Определение рабочего объема колонки

Объем элюции, мл	Вещества-маркеры	
	Голубой декстран	Рибофлавин
	600 нм	440нм
8	0,0007	0,0025
10	0,0091	0,0083
12	0,0286	0,0111
14	0,0072	0,0048
16	-	0,0026
18	-	0,0013
20	-	0,0012
22	-	0,0017
24	-	0,0044
26	-	0,0225
28	-	0,0236
30	-	0,012

2.2.5Получение фракций пептидов методом гель-фильтрации

Подготовка и нанесение исследуемого материала: Готовили 10% гомогенат перги на 0,9% NaCl. Фильтровали через ватно-марлевый тампон 3 раза для очистки от балластных примесей. Центрифугировали на рефрижераторной центрифуге 40 мин при 8000 оборотов, надосадочную жидкость отфильтровывали 3-4 раза через фильтры «белая и красная лента» для избавления от хорошо видимого липидного слоя, крупномолекулярных белков и балластных остатков. Повторно центрифугировали на рефрижераторной центрифуге 40 мин при 8000 оборотов, надосадочную жидкость отфильтровали 2 раза через фильтр «красная лента». В полученном растворе не наблюдалось видимых взвесей

и помутнений – это и есть исследуемый 10% экстракт перги, который хранили при - 40°C не более 1 месяца.

Далее 0,5 мл экстракта наносили на колонку с Sephadex G-25 (предварительно уравновешенную одним объемом 0,9% NaCl).

Элюирование пептидов с колонки проводили 0,9% раствором NaCl. Собирая фракции объемом 2 мл, концентрацию определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, строили профиль элюции пептидов.

2.2.6 Определение молекулярной массы пептидов методом гель-фильтрации

Через колонку пропускали 0,2%-ный раствор голубого декстрана объёмом 0,3 мл, а также растворы цитохрома С, БОК-КБЗ-L-лизина и рибофлавина того же объёма концентрацией в 1мг/мл, собирали фракции объёмом 1 мл. В качестве элюирующего раствора использовали 0,9%-ный раствор хлорида натрия. Затем измеряли величину оптической плотности полученных фракций при 600 нм для голубого декстрана, при 440 нм – для рибофлавина, при 206 нм для цитохрома С и БОК-КБЗ-L-лизина на спектрофотометре СФ-2000. По результатам, представленным в таблице были построены графики элюции, которые отображены на рисунках 1,2.

Складывая объёмы всех фракций, вышедших до максимума поглощения при 600 нм, нашли свободный объём колонки, который составил 9 мл. Внутренний объём колонки вычислили как разность между объёмом элюции рибофлавина и свободным объёмом по формуле 1:

$$V_{\text{внутр.}} = V_{\text{эл(рибофл)}} - V_{\text{своб.}} \quad (1)$$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Химический состав пыльцы и перги во многом схож, но имеются и существенные отличия (таблица 4). Например, в перге значительно шире представлены витамины. Причиной тому являются дрожжи, входящие в состав перги. Они синтезируют витамины, обогащают ее некоторыми белками, липидами и ферментами. Большинство видов дрожжей ферментируют с образованием кислоты: сахарозу, глюкозу, мальтозу, галактозу, арабинозу и ряд других углеводов [22,24].

Таблица 4

Сравнение химического состава пыльцы и перги

	Химический состав пыльцы (%)	Химический состав перги (%)
Жиры	18	34,8
Углеводы	3,33	0,67-1,58
Белки	22-44	18-21,74
Минераль ные вещества	2,55	2,43
Молочная кислота	0,55	3,06-3,2
Витамины, (мг,%)	А – 0.6-212.0 С – 7.0-205 Е – 0.3-17.0 D – 0.2-0.6 P – 1.7-2.4 H – 0-0.65 B1 – 0.5-1.5 B2 – 0.5-2.5 B3 – 4.8-21.0	А – 50 С – 140-205 Е – 170 D – 0.2-0.6 P – 60 B2 – 0.4-0.5

	B5 – 0.32-5.0 B6 – 0.5-0.9 B12 – 0.1	B6 – 0.54-1.9 B12 – 0.5-0.9
Ферменты	Амилаза, инвертаза, фосфатаза, каталаза, пероксидаза, фосфорилаза, трегалаза и др.	Амилаза, кислая и щелочная фосфатаза, инвертаза, каталаза, пероксидаза, фосфорилаза, трегалаза и др.
Вода	5-35	До 18

3.1 Разработка метода получения пептидов перги

Нами был разработан метод получения пептидов перги. Способ получения пептидов состоял из нескольких этапов:

- 1) Предварительная откачка рамок с пергой на медогоне, их высушивание вне улья и глубокая заморозка ($t = -40^{\circ}\text{C}$);
- 2) Гомогенизация 10 г перги в фарфоровой ступке с пестиком в 100 мл 0,9% раствора NaCl;
- 3) Фильтрация балластных примесей и центрифугирование 40 минут при 8000 об/мин с охлаждением;
- 4) Отбор надосадочной жидкости и повторная фильтрация для избавления от хорошо видимого липидного слоя и балластных остатков;
- 5) Повторное центрифугирование 40 минут при 8000 об/мин с охлаждением и фильтрация надосадочной жидкости.

В итоге надосадочная жидкость представляет собой прозрачную жидкость желтоватого цвета. Далее 10% экстракт наносили на колонку с Sephadex G-25, полученные фракции после гель-фильтрации представляют

собой водные растворы среднемолекулярных и низкомолекулярных пептидов перги.

3.2 Результаты определения белков и пептидов методом Лоури

После проведения расчетов для приготовления необходимых растворов для определения белков и пептидов по методу Лоури нужно взять следующее количество веществ:

Реактив А: 0,78 г сульфата меди + 1,35 тартрата натрия на 100 мл воды.

Реактив В: 2 г гидроксида натрия + 20 г карбоната натрия (безводного) на 1000 мл воды.

Реактив С: 50 мл реактива В + 1 мл реактива А.

Раствор БСА: 0,01 г БСА на 100 мл воды.

Данные, полученные проведения стандартного разведения БСА и анализе на КФК-3 с целью построения калибровочного графика преведены в таблице 5. Измерения проводили в 3х повторностях и находили среднее значение оптической плотности для каждой концентрации (D_{cp}).

Калибровочный график строили по результатам приведенным в таблице 5.

Таблица 5

Данные для построения калибровочного графика

C,мкг/мл	D₁	D₂	D₃	D_{cp}
0	0	0	0	0
10	0,055	0,06	0,065	0,06
20	0,12	0,11	0,13	0,12
30	0,146	0,154	0,15	0,15

40	0,207	0,214	0,209	0,21
50	0,258	0,262	0,26	0,26
60	0,31	0,30	0,32	0,31
70	0,343	0,354	0,35	0,35
80	0,447	0,414	0,439	0,40
90	0,459	0,445	0,446	0,45
100	0,51	0,483	0,477	0,49

Таблица 6

Итоговые данные для построения калибровочного графика

С,мкг/мл	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
D ср., нм	0	0,06	0,12	0,15	0,21	0,26	0,31	0,35	0,40	0,45	0,49

Калибровочный график БСА имеет форму диагональной прямой (рис. 1.)

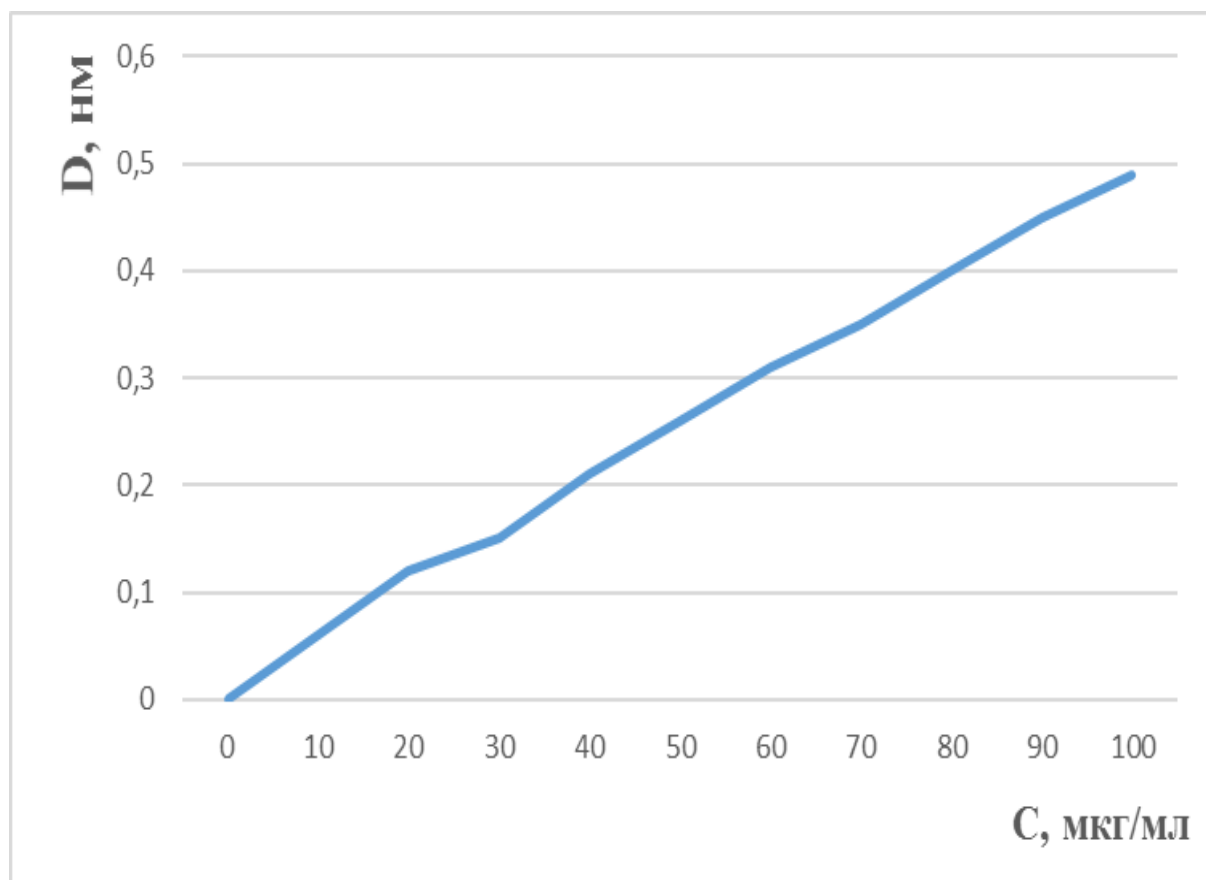


Рис. 1 Калибровочный график БСА. По оси X- значение оптической плотности (нм), по оси Y- значение концентрации (мкг/мл)

Данные после анализа белковой и пептидной фракции перги на КФК-3 при длине волны 750 нм перед кипячением и центрифугированием при комнатной температуре при 5000 обр/мин. С 10% ТХУ представлены в таблице 7

Таблица 7

Значение оптической плотности для определения концентрации белков и пептидов в перге.

D ₁	D ₂	D ₃	D _{ср.}
0,168	0,160	0,168	0,165

Среднее значение оптической плотности:

$$D_{\text{cp}} = 0,168 + 0,160 + 0,168/3 = 0,165$$

Полученные значения оптической плотности откладывали на калибровочном графике по оси X до пересечения с графиком БСА. После чего проводили касательную на ось Y. Полученный график представлен на рисунке 2.

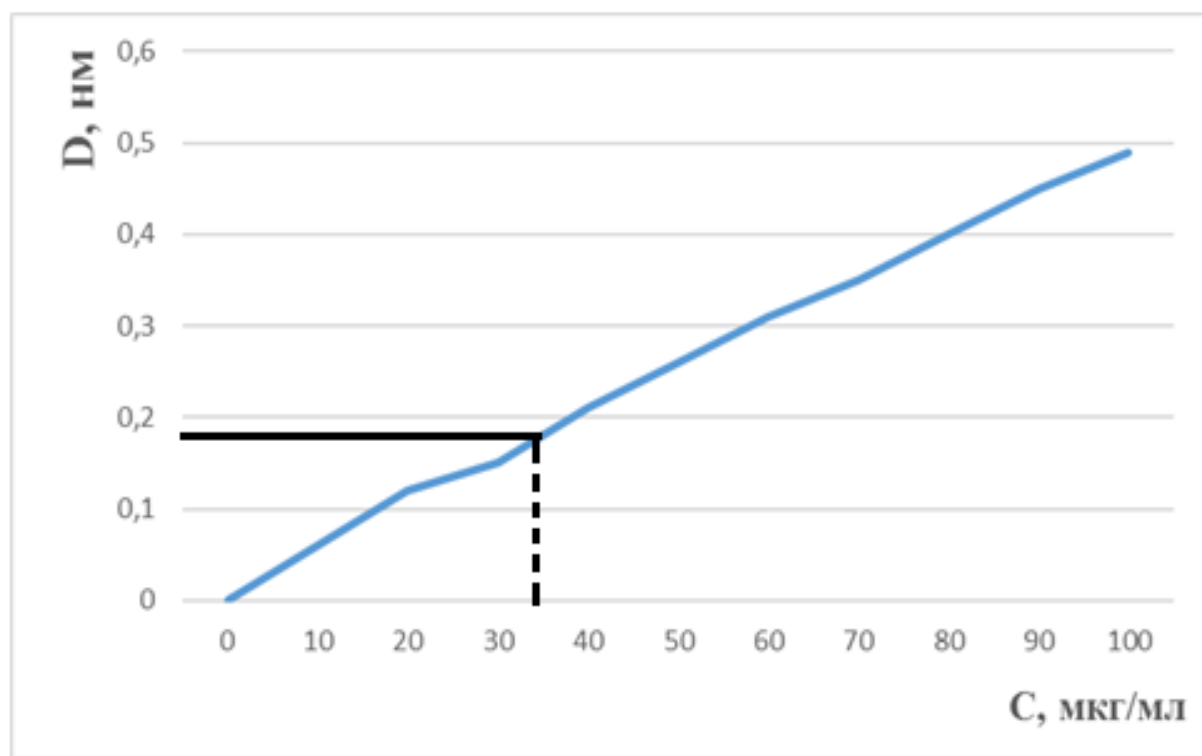


Рис.2. Определение концентрации пептидов и белков перги 0,5 мл образца

Таким образом, полученные значения длины волны (D_{cp}) для белков и пептидов перги соответствует концентрации 32,5 мкг/мл в 0,5 мл 20% раствора.

В 100 мл 20% раствора концентрация белков и пептидов составила соответственно $32,5 \cdot 200 = 6500$ мкг/мл или 0,0065 г/мл.

Следовательно в 100 мл неразбавленного раствора перги концентрация белков и пептидов равна $0,0065 \cdot 5 = 0,0325$ г/мл.

После кипячения и последующей фильтрации раствор очистили от белков. В связи с тем, что раствор все еще имел не прозрачный желтоватый цвет, провели центрифугирование с 10% ТХУ. После центрифугирования

при комнатной температуре 5000 обр/мин. В пробирках наблюдалось выпадение осадка белка. В связи с этим раствор приобрёл более светлый оттенок, но все же был мутный из-за наличия липидной фракции.

Данные после анализа пептидной фракции перги на КФК-3 при длине волны 750 нм после кипячения и центрифугирования при комнатной температуре при 5000 обр/мин. С 10% ТХУ представлен в таблице 8

Среднее значение оптической плотности находили по формуле:

$$D_{\text{ср}} = 0,074 + 0,77 + 0,075 / 3 = 0,075$$

Таблица 8

Значение оптической плотности для определения концентрации белков и пептидов фракций перги после очистки от высокомолекулярных белков

D ₁	D ₂	D ₃	D _{ср}
0,074	0,077	0,075	0,075

Полученные значения оптической плотности откладывали на калибровочной графике по оси X до пересечения с графиком БСА. После чего проводили касательную на ось Y полученный график представлен на рисунке 3.

Таким образом, полученные значения длины волны (D_{ср}) для пептидов перги соответствует концентрации 12,5 мкг/мл в 0,5 мл 20% раствора.

В 100 мл 20% раствора концентрация пептидов составила соответственно $12,5 \cdot 200 = 2500$ мкг/мл или 0,0025 г/мл.

Следовательно, в 100 мл неразбавленного раствора перги концентрация пептидов равна $0,0025 \cdot 5 = 0,0125$ г/мл.

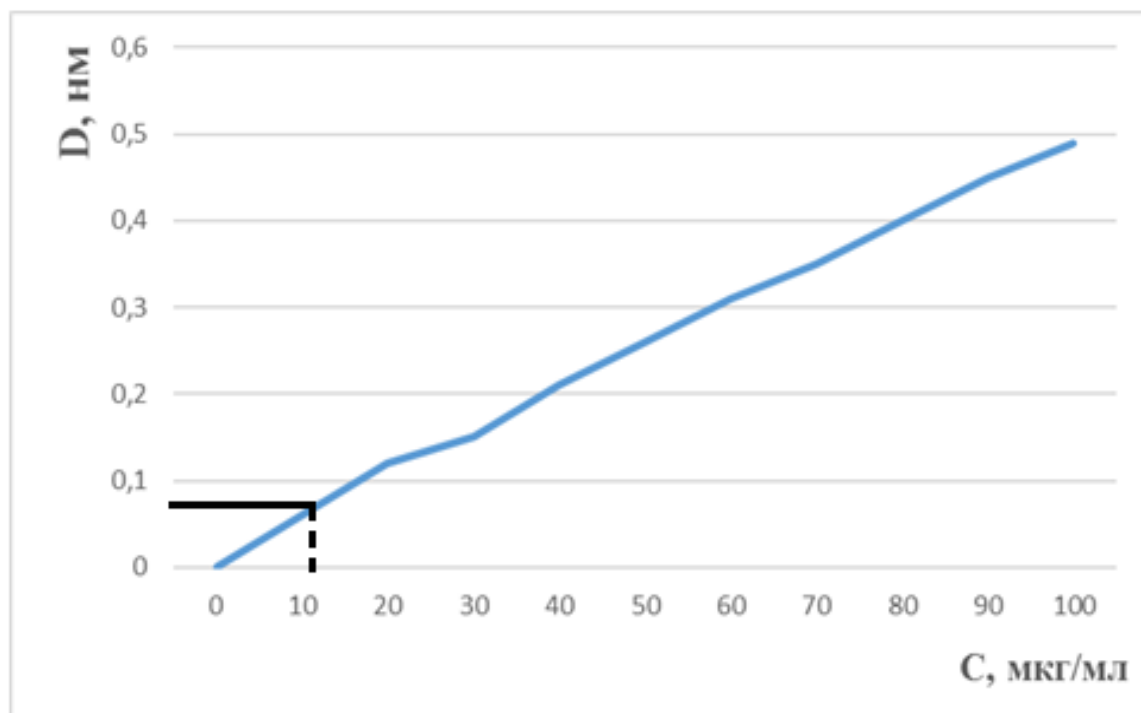


Рис. 3. Определение концентрации пептидов перги в 0,5 мл образца.

3.3 Результаты гель-фильтрации

Изучение физико-химических свойств полученных пептидов проводилось методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25, позволяющем разделить белки и пептиды по размеру молекул.

Определили рабочий объем колонки по формуле $V_{\text{внутр}} = V_{\text{эл рибофлавина}} - V_{\text{св}}$, где $V_{\text{внутр}}$ – это внутренний объем колонки, $V_{\text{эл рибофлавина}}$ – объем элюции рибофлавина и $V_{\text{св}}$ – свободный объем. Построили график по данным из таблицы 9

Таблица 9

Определение рабочего объема колонки

Объем элюции, мл	Вещества-маркеры	
	Голубой декстран	Рибофлавин
	600 нм	440нм
8	0,0007	0,0025
10	0,0091	0,0083
12	0,0286	0,0111
14	0,0072	0,0048
16	-	0,0026
18	-	0,0013
20	-	0,0012
22	-	0,0017
24	-	0,0044
26	-	0,0225
28	-	0,0236
30	-	0,012

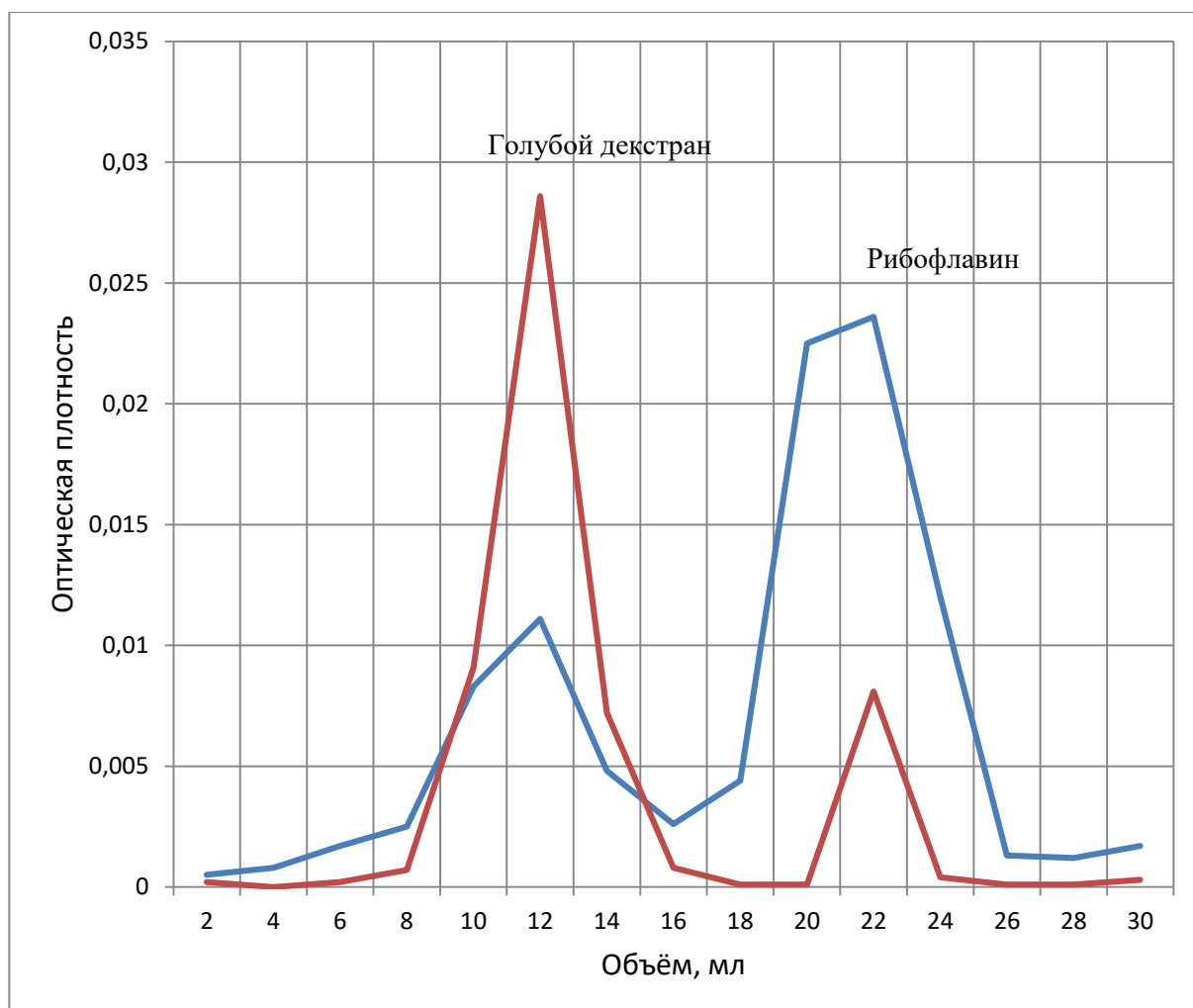


Рис.4. Профиль элюции маркерных веществ - голубого декстрана и рибофлавина (--- голубой декстран, --- рибофлавин)

Определили молекулярную массу пептидов: Складывая объёмы всех фракций, вышедших до максимума поглощения при 600 нм, нашли свободный объём колонки, который составил 9 мл. Внутренний объём колонки вычислили как разность между объёмом элюции рибофлавина и свободным объёмом по формуле: $V_{\text{внутр.}} = V_{\text{эл(рибофл)}} - V_{\text{своб}}$

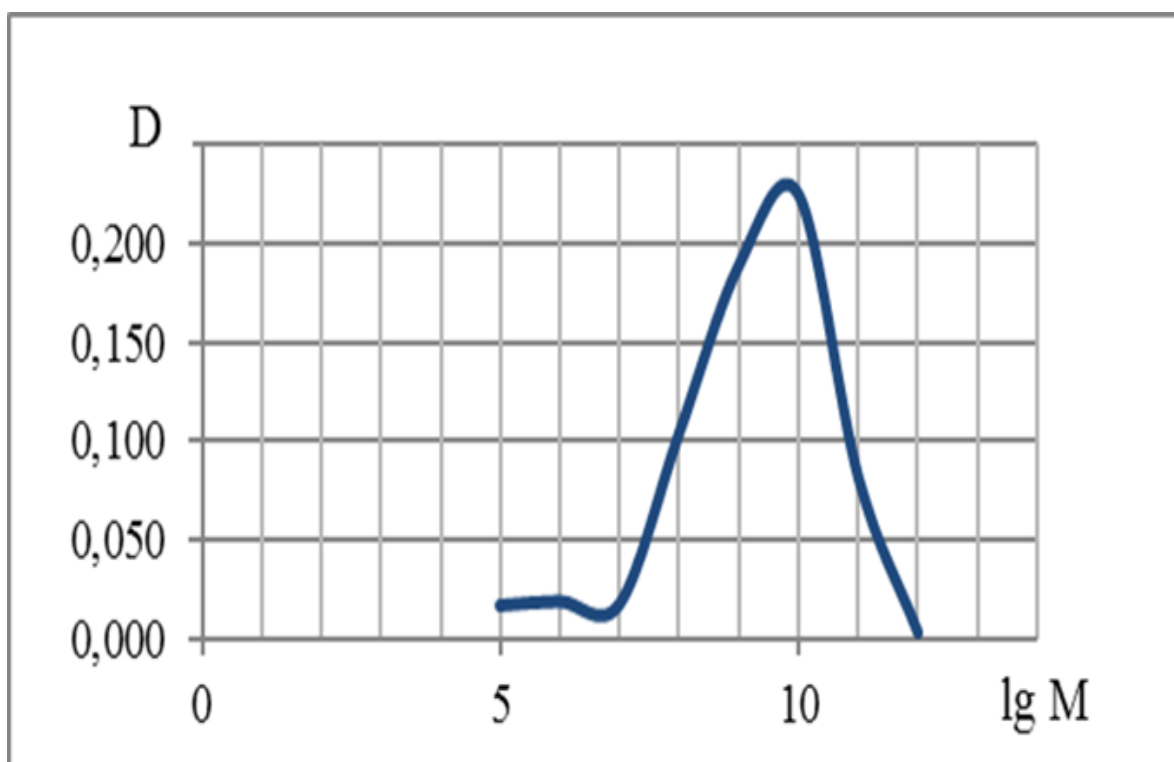


Рис.5. Профиль элюции раствора цитохрома С

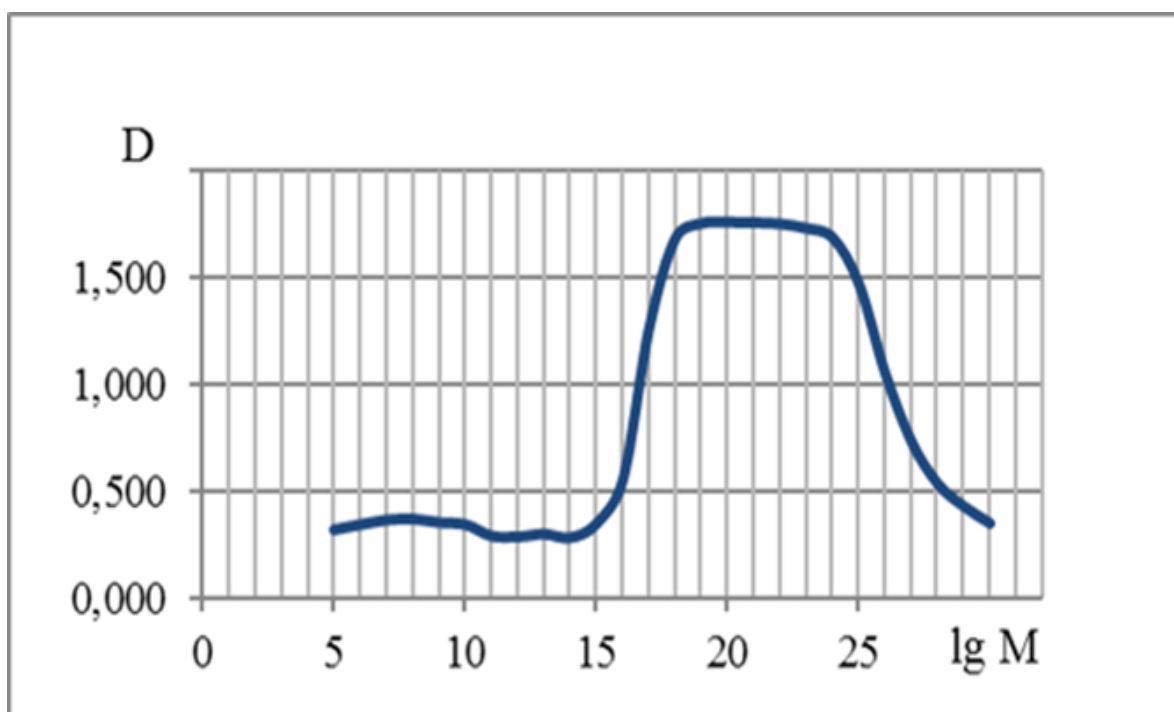


Рис.6. Профиль элюции раствора БОК-КБЗ-Л-ЛИЗИНА

По данным, приведенным в таблице 10, были построены профили элюции пептидов перги (Рис. 7).

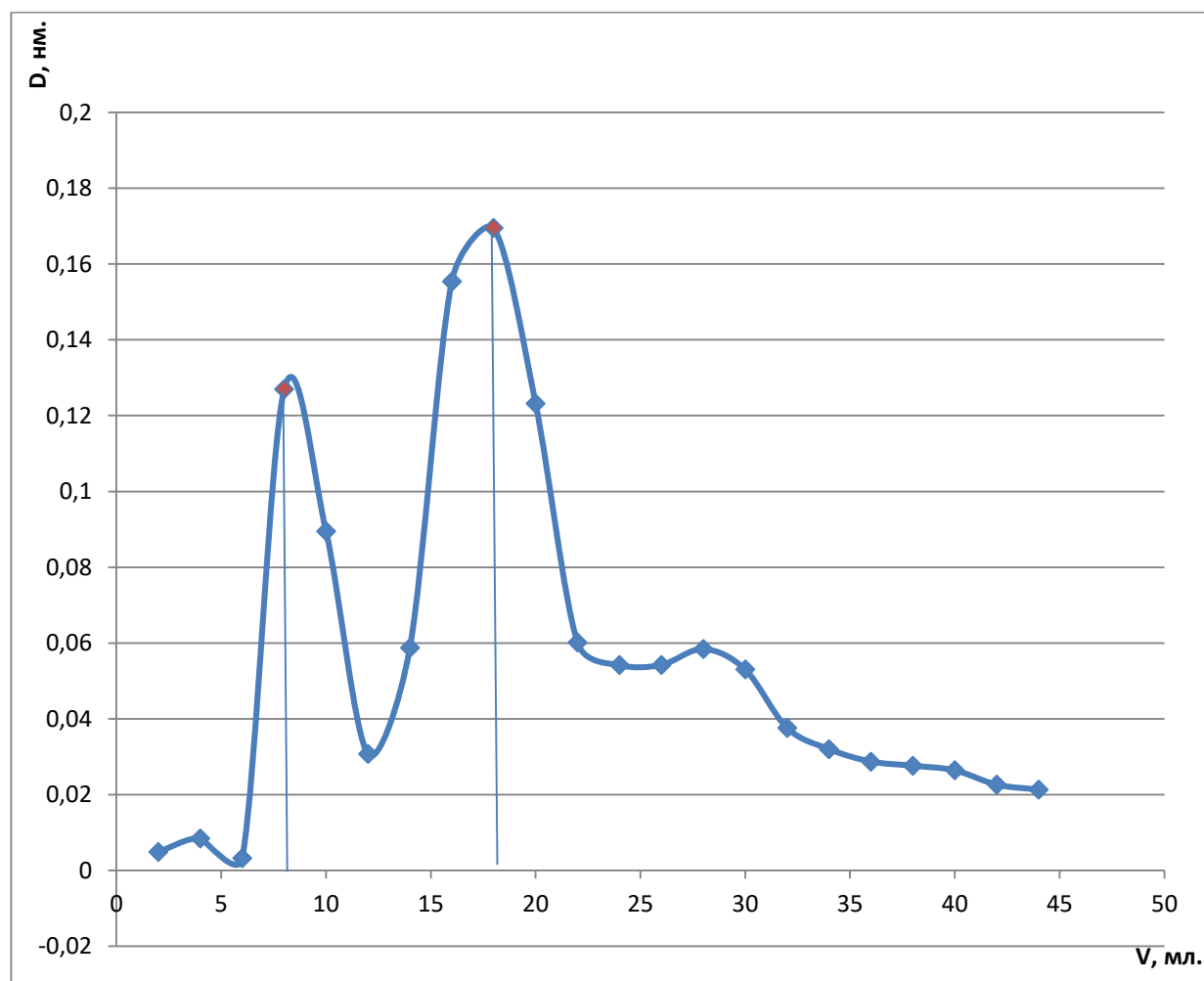


Рис.7. - Профиль элюции пептидов перги

Данная колонка имеет объём = 25 мл., диаметр = 1 см., длину = 34 см., скорость элюции = 20 мл/час. Первый - белковый пик представлен спектром с молекулярными массами >5000 Да. Пептидный профиль представлен широким спектром с молекулярными массами 1000-5000 Да. Именно эта, вторая пептидная фракция, была изучена в качестве группы №3. В составе группы №2 была изучена фракция, включающая в себя и белковый, и пептидный пики (экстракт перги).

Фракционирование экстракта перги на Sephadex G-25.

№	V, мл	D, нм
1	2	0,0049
2	4	0,0084
3	6	0,0032
4	8	0,1269
5	10	0,0895
6	12	0,0307
7	14	0,0587
8	16	0,1554
9	18	0,1695
10	20	0,1232
11	22	0,0601
12	24	0,0542
13	26	0,0542
14	28	0,0584
15	30	0,053
16	32	0,0376
17	34	0,032
18	36	0,0287
19	38	0,0276
20	40	0,0264
21	42	0,0226
22	44	0,0213

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод получения пептидов перги, молекулярной массой преимущественно 5-10 кДа.
2. Выявлено, что перга содержит достаточное количество пептидов средней молекулярной массы.
3. Перга содержит большое количество пептидов, которые могут быть разделены на отдельные пептиды сочетанием биохимических методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрафикова, Д.Ш. Развитие пчеловодства в России и в мире / Д.Ш. Абдрафикова, З.А. Залилова. –Матер. Междунар. Электронной студ. науч. конф., 2012.
2. Астрадаускаене, А.Э. Ботанический анализ перги / А.Э. Астрадаускаене, А.Ю. Мачекас, К.В. Кадзяускаене, Д.И. Кондротене // Пчеловодство.— №3—1990.
3. Ашмарин, И.П. Нейрохимия/ И.П. Ашмарин, П.В. Стукалова. – М.: Институт биомедицинской химии РАМН, – 1996. – 470 с.
4. Асафова, Н.Н. Физиологически активные продукты пчеловодства / Под ред. Б.Н. Орлова, – Нижний Новгород: Изд-во Ю.А. Николаев, 2001. – 368 с.
5. Батуев, Ю.М. Пчеловодство: (маленькая энциклопедия) / Ю.М. Батуев, Г.Д. Биладш, С.Я. Болдырев, – М.: Советская энциклопедия, 1991. – С.258-259, С. 418-420.
6. Буренин, Н.Л. Справочник по пчеловодству /Н.Л. Буренин, Г.Н. Котова, М.: Колос,1977, 292 с.
7. Виноградова, Т.В.Пыльца и перга химический и биологический состав /Г.П. Зайцева,Т.В. Виноградова.М.: Наука, Энциклопедия пчеловодства, 2010.– 121 с.
8. Гомазков, О. А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов/ О. А. Гомазков. М.: Наука, 1992. – 160 с.
9. Голощапов, В.М. Пищевые добавки и кремы / В.М. Голощапов Апитерапия пчеловодства, 2004. – С.20-25.
10. Еремия, Н.Г. Биохимический состав пыльцы / Н.Г. Еремия, Н.М. ЕремияМатер. Всесоюзной конф. 4.2. Днепропетровск.1998. С. 19-30.
11. Еськов, Е.К. Экология медоносной пчелы. /Еськов Е.К.Рязань. Русское слово, 1995.– 392с.

12. Ерошенко, Т.М. Физиологические свойства регуляторных пептидов /Итоги науки и техн. ВИНТИ. Сер. физиол.чел. жив. – 1989. – №51. – С. 1-164.
13. Иванов,Ю.Ц. Изучение активности некоторых ферментов цветочной пыльцы / Апиак-та. 1984. - №19., Т.3. – С.77-79.
14. Коржевский, Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. –Санкт-Петербург : СпецЛит, 2010– 96 с.
15. Кривцов, Н.И. Пчеловодство / Н.И. Кривцов, В.И. Лебедев, В.И. Туников. – М.: Колос, 2007. – 512 с.
16. Лебедев, В.И. Биология медоносной пчелы./В.И. Лебедев, Н.Г. Билаш – М.: Агропромиздат, 1991. – 239 с.
17. Лошина, Л.А. Регуляторная роль протеолитических ферментов / Мол. Биология. – 1979. – Т.13, № 6. – С. 1205-1229.
18. Лудянский, Э.А.. Руководство по апитерапии (лечение пчелиным ядом, мёдом, прополисом, цветочной пыльцой и другими продуктами пчеловодства) для врачей, студентов медицинских вузов и пчеловодов. Вологда : [ПФ "Полиграфист"], 1994. – С. 462.
19. Люсов, В.А. Применение продуктов пчеловодства в комплексном лечении ишемической болезни сердца / В. А. Люсов, В.А. Дудаев Апитерапия сегодня: Тез. Докл. Науч.-практ. Конф. – Рыбное, 1994. – С.47-49.
20. Макарова, В.Г. Иммунобиологическое действие меда, пыльцы и прополиса / В.Г.Макарова, М.В. Семенченко, Е.Н. ЯкушеваПчеловодство. – 1998. - №5. – С. 52-53.
21. Макарова В .Г., Якушева Е.Н., Семенченко М.В. О безопасности длительного применения продуктов пчеловодства // В.Г. Макарова, Е.Н. Якушева, М.В. Семенченко Апитерапия сегодня: Материалы III науч.-практ. конф. по апитерапии. Рыбное, 1994а. - С. 14-17.

22. Мачекас, А.Ю. Исследование динамики изменений витаминов в законсервированной обножке / А.Ю. Мачекас, А.Э. Астраускене Апитерапия. Биология и технология продуктов пчеловодства: Мат. Всесоюз. Конф. – Днепропетровск: ДГУ, 1988. – Ч.1. – С. 37-43

23. Мамонов, Р.А. Технология заготовки и подготовки пчелиных сотов к промышленной переработке на пергу и восковое сырье / Р.А.Мамонов, Т.В. Торженева, Вестник ФГБОУ ВПО РГАТУ 2013. №2 (18). С.30-31.

24. Наумкин, В.П. Сравнительная оценка аминокислотного состава цветочной пыльцы / Биологически активные продукты пчеловодства и их использование: Межвуз. сб. науч. тр. – Горький, 1990. – С. 90-101.

25. Некрашевич, В.Ф. Сушка перговых сотов / В.Ф. Некрашевич, В.И. Бронников, С.В. Винокуров, Пчеловодство. – 2003. - №1. С. 51- 52.

26. Некрашевич, В.Ф. Осцилирующая сушка перги – способ борьбы с восковой молью / В.Ф.Некрашевич, С.В. Винокуров Пчеловодство. – 2005. - №1. С. 51.

27. Некрашевич, В.Ф. Развитие производства перги в России / В.Ф.Некрашевич, Р.А. Мамонов, С.В. Некрашевич, Т.В. Торженева Пчеловодство. – 2010. - №6. – С. 48-50.

28. Омаров, Ш.М Апитерапия: продукты пчеловодства в мире медицины. / Ростов н/Д : Феникс, 2009. –351 с.

29. Орлов, Б.Н. Проблемы апитерапии // Пчеловодство.– 1993. –№4. С. 19 – 20.

30. Раевский, К.С. Эндогенные опиоидные пептиды как возможные нейротрансмиттеры / в кн. «Опиоидные пептиды и их рецепторы». – Итоги науки и техники ВИНТИ. – 1982. - №13. – С.185-200.

31. Туников, Г.Н. Пчела и человек / Г.Н. Туников, Н.И. Кривцов, В.И. Лебедев. – М.: Колос С, 2006. – С.28-32.

32. Хельмут Хорн, Гехард Лейбольт; пер с нем. М.Беляева. Лекарства из улья: мёд, пыльца, маточное молочко, пчелиный воск, прополис, пчелиный яд / М.: АСТРЕЛЬ, 2006 – С.238.
33. Херольд, Э. Новый курс пчеловодства / Э. Херольд, К. Вайс. – М.: АСТ «Артель», 2007. – С.368.
34. Хисматуллина, Н. З. Апитерапия. - Пермь: Мобиле, 2005. - 296 с.. 2005
35. Шкендеров, С.В. Пчелиные продукты / С.В.Шкендеров, И.И. Цеко – Болгария.: Земиздат. София, 1985. – С. 201-222.
36. Eipper, B.A., Green C.B., Mains R.E. Expression of prohormone processing enzymes in neuroendocrine and non-neuroendocrine cells // Monogr. Natl. Cancer. Inst. – 1992 - № 13. – P. 163-168
37. Duggan, A.W. Enkephalins as transmitters in the central nervous system / Circ Res. – 1980. – V.46. – N.6. – Suppl.1. – P.149-1-153.
38. H.Ali Dondas, Necat Yilmaz, Ulku Comelekoglu. Prevention of calcification with TPEN in pericardial bioprosthetic heart valve material., Faculty of Medicine, Mersin University, Mersin, Turkey, Anadolu Kardiol Derg, № 4, — 2007 — P. 365-370.
39. Hauser, F, Cazzamali G, Williamson M et al. A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. Prog Neurobiol 2006; 80:1-19.
40. Hook, Y.J.H., Eiden L.E., Pruss R.M. Selective regulation of carboxypeptidase peptide hormone-processing enzyme during enkephalin biosynthesis in cultured bovine adrenomedullary chromaffin cells // J. Biol. Chem. – 1985. – V. 260, № 10. – P – 5991- 5997.
41. Isaac, RE, Taylor CA, Hamasaka Y et al. Proctolin in the post-genomic era: New insights and challenges. Invert Neurosci 2004; 5:51-64.
42. Krieger, D.T. Brain peptides: what, where and why? // Science. – 1983. – V.222. – N.462. – P.975-985.

43. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. - №1. – P.265-275.
44. Taber, S. Drones their value to you // Amer.Bee J. – 1973. – V. 113, №8. – P. 302-304.
45. Waring, C. Rafter Beekeeping in Cambodia with *Apis dorsata* / C. Waring, D.R. Jamp // Bee World. – 2004. – Vol.85, №1.
46. Yang, XY, Yang DS, Wei-Zhang, Wang JM, Li CY, Hui-Ye, Lei KF, Chen XF, Shen NH, Jin LQ, Wang JG. 10-Hydroxy-2-decenoic acid from Royal jelly: a potential medicine for RA. // Journal of ethnopharmacology. – 2010 – 128(2): 310-314.

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

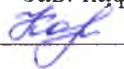
Факультет
физико-математических
и естественных наук

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 Афанасьевой Ангелины Александровны

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

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 201 6 г. № 1191 а/с

Срок сдачи студентом законченной работы « 16 » мая 201 7 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения и главы 1. Обзор литературы («Биологические и физиологические свойства перги»; «Биохимический состав перги»; «Липиды (жиры) цветочной пыльцы (пчелиной обножки»; «Регуляторные пептиды и физиолого-биохимические аспекты их действия»)	Ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Подбор и теоритическое изучение предполагаемых методик исследования.	Февраль 2017	Выполнено
3	Отработка методов исследования, построение калибровочных графиков, приготовление реактивов для практической части.	Февраль-Март 2017	Выполнено
4	Лабораторные исследования, получение экспериментальных данных.	Март-Апрель 2017	Выполнено
5	Статистическая обработка полученных результатов.	Апрель 2017	Выполнено
6	Написание глав «Материалы исследования»; «Результаты исследований»; «Выводы»	Апрель-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания « 2 » 11 2016г.

Руководитель _____

(подпись)

Задание принял к исполнению _____

(подпись)