

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:

**«РАЗРАБОТКА ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ИЗ
ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА»**

Студент  Антонова Марина Николаевна

Руководитель  Соловьев В. Б.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 20.06.17 № 9)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Иммунодефицитные состояния.....	6
1.1.1 Иммунодефицитные состояния первого типа.....	6
1.2 Биохимический состав пчелиных продуктов.....	9
1.2.1 Биохимический состав маточного молочка	9
1.2.2 Биохимический состав гомогената трутневого расплода.....	11
1.2.3 Биохимический состав пчелиного меда.....	12
1.3 Иммуностимулирующие препараты.....	13
1.4 Апитерапия.....	16
1.4.1 Медико-биологические свойства меда.....	16
1.4.2 Медико-биологическая активность маточного молочка.....	18
1.4.3 Медико-биологическая активность трутневого расплода.....	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	20
2.1 Метод определения содержания белка методом Лоури.....	20
2.2 Метод определения концентрации углеводов.....	21
2.3 Гель-фильтрация и подготовка колонки.....	21
2.4 Метод ионообменной хроматографии.....	22
2.5 Метод тангенциальной ультрафильтрации.....	25
2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	26
2.7 Лиофилизация.....	27
2.8 Тестирование препарата на иммуотропность.....	27
2.8.1 Тестирование препарата на иммуотропность.....	27
2.8.2 Метод исследования.....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ...29	
3.1 Получение фракций низкомолекулярных пептидов методом гель-фильтрации раствора гомогената трутневого расплода.....	29

3.2 Получение фракции пептидов с молекулярной массой до 10 кДа из растворов пчелопродуктов методом ультрафильтрации.....	30
3.3 Ионообменная хроматография.....	31
3.3.1 Анионообменная хроматография.....	32
3.3.2 Катионообменная хроматография.....	32
3.4 Анализ спектра анионных и катионных пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	34
3.5 Оценка влияния пептидной фракции пчелопродуктов на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции при моделировании экспериментального сепсиса у крыс.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	42
ЛИТЕРАТУРА.....	43

ВВЕДЕНИЕ

Ухудшение экологической обстановки резко ослабляет защитную реакцию организма, вызывает развитие многих заболеваний. В последние годы резко возрос интерес к иммуностимулирующей терапии, который в свою очередь связан с проблемами инфекционной патологии и онкологии. Многие ученые на сегодняшний день решают главную задачу: осуществить поиск веществ, обладающих биологически активными свойствами, а также на их основе получить новые лекарственные препараты, которые применяются при нарушениях иммунной системы организма [39].

Разного рода нарушения иммунной системы делают организм более уязвимым к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, вырастает вероятность возникновения опухолей и иммунных процессов. Также недостаточное поступление в организм витаминов, микроэлементов и органических кислот способствует появлению иммунодефицита. Как раз выше перечисленные компоненты имеются в составе меда и других пчелопродуктах. Поэтому более длительный прием таких продуктов помогает организму нормализовать иммунную систему или предупредить ослабление ее защитных факторов.

Мед, цветочная пыльца, маточное молочко, прополис, перга, трутневый расплод – единственные в своем роде продукты природы, содержащие в сбалансированном сочетании ряд важнейших биологически активных компонентов. Которые обладают высокой терапевтической активностью, они действуют мягче синтетических лекарственных средств, характеризуются высокой степенью безопасности, а относительная дешевизна делает их доступными практически для всех социальных слоев населения [23;10].

С. Младеновым было установлено, что ежедневное употребление меда в суточной дозе 120 г в течение 20 дней повышает фагоцитарную

активность лейкоцитов на 7% [21]. Иммуностропное действие цветочной пыльцы характеризуется активацией клеточного иммунитета. Это свойство обнаружено у белковых гидролизатов пыльцы и перги, причем активность перги выше почти в два раза [14].

К настоящему времени по данным исследований последних лет можно сказать, что в маточном молочке, гомогенате трутневого расплода изучено небольшое количество индивидуальных пептидов. Так как биологически активные пептиды влияют практически на все физиологические процессы и регулируют деятельность всех регуляторных систем, то перспективным направлением является - создание новых лекарственных препаратов.

Данная тема актуальна, что подтверждается наличием исследований по данной тематике, в частности на нашей кафедре «ОБиБ», но которые освещены недостаточно, чтобы раскрыть данный вопрос. **Целью** работы является: разработка способа оценки биологической активности иммуностимулирующего фактора из продуктов пчеловодства, проверка иммуностропного действия этих факторов.

В ходе выполнения ВКР были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести анализ современной литературы на тему: Иммуностимулирующие свойства пчелиных продуктов.
2. Выделить пептиды мёда, гомогената трутневого расплода, перги.
3. Концентрировать растворы данных продуктов с параллельным отделением пептидной фракции от общей белковой.
4. Провести оценку метода на иммуностропность пептидов выделенных из пчелопродуктов.

Бакалаврская работа написана на 49 листах, содержит 9 рисунков, 7 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 56 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Иммунодефицитные состояния

1.1.1 Иммунодефицитные состояния первого типа

Иммунодефицитное состояние (ИДС) – это состояние, которое характеризуется пониженной активностью или неспособностью организма к эффективному осуществлению реакций гуморального или клеточного звена иммунитета.

Выделяют следующие классификации ИДС по этиологии:

- первичные (наследственные);
- вторичные (приобретенные);
- физиологические.

Первичные ИДС – это генетически обусловленная неспособность организма реализовать то или иное звено иммунного ответа. Как известно, эндогенные генетически обусловленные дефекты одного из компонентов иммунной системы приводят к сбою системы защиты организма и клинически определяются как одна из форм первичного ИДС.

ВОЗ в 1997 г. выделила порядка 70 идентифицированных генетических дефектов на различных уровнях преобразования стволовых клеток в Т- и В-лимфоциты или последующих этапах их дифференцировки, которые лежат в основе первичных ИДС.

За последние годы в связи с обнаружением молекулярных дефектов, составляющих основу многих иммунодефицитов, и существенной вариабельностью клинической картины и тяжести их течения, становится ясно, что первичные ИДС – это не столь редкое состояние, как это считалось до настоящего времени. Частота достаточно большой части первичных ИДС составляет 1/25000 - 1/50000, однако такие варианты врожденных иммунных дефектов, как селективный дефицит IgA, встречается с частотой 1/500 - 1/700 человек. Исследуя ряды статей

некоторых авторов, недостаточность В-системы лимфоцитов и гуморального звена иммунитета отмечается у 50-75% от общего числа больных ИДС. Порядка 20% случаев отмечается комбинированная недостаточность гуморального и клеточного иммунитета, в в 18% - недостаточность фагоцитоза, 10% - изолированная недостаточность клеточного иммунитета, и в 2% - недостаточность комплемента системы ИДС.

На нескольких этапах созревания Т-лимфоцитов - от стволовой клетки до развития их специализированных субпопуляций проявляется патология клеточного звена иммунитета [33].

В случае, когда возникает недостаточность Т-системы лимфоцитов, возникает онкогенноопасная ситуация. Появляются такие заболевания, как синдром Ди Джорджи, синдром Незелофа [15].

1. 1. 2 Иммунодефицитные состояния второго типа.

Вторичный иммунодефицит представлен нарушениями иммунной системы, которая развивается в позднем постнатальном периоде у взрослых и детей и не являющийся результатом какого-то генетического дефекта. Эти нарушения несут в себе гетерогенный механизм происхождения, который приводит к повышенной инфекционной заболеваемости.

Характеризуется вторичный иммунодефицит обязательным присутствием инфекции гнойно-воспалительного процесса. Важно отметить, что сама инфекция может быть как проявлением, так и причиной нарушения иммунного ответа.

Под действием различных факторов (инфекции, лучевое лечение, фармакотерапия, различные стрессовые ситуации, травмы и др.) может сформироваться несостоятельность иммунного ответа, которая может привести к развитию как транзиторных, так и необратимых изменений в

иммунном ответе. Эти изменения могут быть причиной ослабления противoinфекционной защиты [22].

Ведущую роль в развитии вторичных иммунодефицитов играют хронические вирусные инфекционные заболевания (ВИЧ, цитомегаловирусная инфекция, вирусы Эйнштейна-Барра и другие герпес-вирусы, реже корь, краснуха, вирусные гепатиты и т. д.), вызывая подавление клеточного и гуморального иммунитета. Неблагоприятное влияние на иммунный статус оказывает бактериальная и грибковая инфекция, паразитарные заболевания.

Снижается иммунитет при длительном приеме некоторых лекарственных препаратов, обладающих подавляющим действием на костный мозг и кроветворение, нарушающих формирование и функциональную активность лимфоцитов (цитостатики, глюкокортикоиды и пр.). Схожий эффект оказывает и лучевое воздействие.

При злокачественных новообразованиях происходит продукция опухолью иммуномодулирующих факторов и цитокинов, в результате чего снижается количество Т-лимфоцитов, увеличивается активность клеток-супрессоров, угнетается фагоцитоз. Ситуация усугубляется при генерализации опухолевого процесса и метастазировании в костный мозг.

Вторичные иммунодефициты нередко развиваются при аутоиммунных заболеваниях, острых и хронических отравлениях, у людей старческого возраста, при длительных физических и психоэмоциональных перегрузках.

Клинические проявления характеризуются наличием в организме затяжного, устойчивого к этиотропной терапии хронического инфекционного гнойно-воспалительного заболевания на фоне снижения иммунной защиты. При этом изменения могут быть преходящими, временными или имеют необратимый характер. Выделяют индуцированную, спонтанную и приобретенную формы вторичных иммунодефицитов.

К индуцированной форме относят нарушения, возникающие вследствие конкретных причинных факторов (рентгеновское излучение, длительный прием цитостатиков), а также при тяжелой соматической патологии (сахарный диабет, гепатиты, циррозы) и злокачественных опухолях.

При спонтанной форме видимый этиологический фактор, вызвавший нарушение иммунной защиты, не определяется [36]. Клинически при этой форме отмечается наличие хронических, трудно поддающихся лечению и часто обостряющихся заболеваний верхних дыхательных путей и легких (синуситы, пневмонии, абсцессы легких), пищеварительного тракта и мочевыводящих путей, кожи и подкожной клетчатки (фурункулы, карбункулы, абсцессы и флегмоны), которые вызваны условно-патогенными микроорганизмами.

1.2 Биохимический состав пчелиных продуктов

1. 2. 1 Биохимический состав маточного молочка

Маточное молочко – это секрет, вырабатываемый верхнечелюстными и глоточными железами медоносных пчел. Оно представляет собой сметанообразную желто-белую массу со специфическим запахом и кисловатым вкусом [42].

Достаточно сложен химический состав маточного молочка, который включает в себя около 65% воды, 14—18% белковых веществ, 9—19% углеводов (сахаров), 1,7—5,7% жиров, а также факторы роста, минеральные соли, половые гормоны, микроэлементы, многие витамины (B1, B2, B6, B12, B3, C, H, PP, фолиевая кислота).

Наибольший интерес представляют собой такие микроэлементы как: марганец, железо, цинк и кобальт, которые играют большую роль в кроветворении. Стимулирующее влияние на половые железы пчелиных маток осуществляется наличием цинка в составе маточного молочка. В

данном субстрате обнаружены биологически активные вещества, такие как, ацетилхолин и фермент, его разрушающий,— холинэстераза.

По своей питательности маточное молочко пчел значительно превосходит коровье молоко [13].

Белки данного вещества содержат в себе 21 аминокислоту, амиды и амины. Доказано, что это все незаменимые аминокислоты (аргинин, гистидин, валин, метионин, триптофан и др.)[43]. Ученые больше всего обращают внимание на лизин (состоящий из карнитина, вследствие чего улучшается работа сердца), аспарагин (улучшает функционирование структурных элементов нервной системы) и глутамин (используется в терапии мышечных заболеваний, связанных с дистрофией).

В маточном молочке пчел содержатся белки, такие, как глобулины (68%) и альбумины (40%), которые в свою очередь являются чрезвычайно важными компонентами крови. Белки маточного молочка относятся к числу хорошо усвояемых. Для сравнения можно сказать, что белки мяса усваиваются организмом человека только на 69—74%, а маточного молочка пчел — на 81% [42].

Маточное молочко пчелы изготавливают из такого компонента, как перга, которая в свою очередь богата витаминами, но получаемый продукт, оказывается превосходит в несколько десятков раз по богатству витаминов исходного продукта. Так, в маточном молочке в 12—16 раз больше содержится биотина и пантотеновой кислоты, чем в перге [3].

В последнее время в маточном молочке были обнаружены нуклеиновые кислоты – ДНК и РНК, которые содержат определенный генетический код, а также ферменты стимулирующие их синтез. Это в свою очередь является программой, запускающей синтез омоложения или обновления каждого структурного элемента человеческого организма, в связи с этим данное вещество может бороться с любым вирусным микроорганизмом [1].

1.2.2 Биохимический состав гомогената трутневого расплода.

Трутневый гомогенат, еще этот продукт называют трутневым молочком, который изготавливают из расплода трутней. Спустя неделю после закладки расплода личинки трутней механическим путем удаляют из сот, после чего измельчают и получают трутневый гомогенат. По своей сути гомогенат представляет собой выжимку из личинок самцов пчел, будущих трутней.

По содержанию белковых соединений данный продукт близок к мясу и грибам, но, в отличие от них, протеины трутневого молочка находятся в более биодоступной форме. Полученная масса напоминает по консистенции очень густую сметану, отличающуюся желтоватым цветом, специфическим вкусом и ароматом [41].

Гомогенат трутневого расплода содержит в своем составе белки, которые легко усваиваются организмом (протеины) – до 20%, аминокислот – 11,4%, углеводов – 5%, жиров – 6,3%,

Продукт содержит около 30 ненасыщенных жирных кислот, комплекс витаминов: жирорастворимые D, E, A, водорастворимые группы B, набор ценных микро- и макроэлементов: железо, калий, кальций, фтор, магний, селен, сера, цинк, молибден, медь, марганец, фосфор, серебро, хром, йод. Высокую ценность гомогенат трутневого расплода имеет благодаря высокому содержанию функциональных групп сульфидрильных ферментов. Присутствие в трутневом молочке гормонов-тестостероидов (эстрадиол и прогестерон) делает его незаменимым при отставании в развитии детей и подростков (физическом, половом, умственном)[18].

1.2.3 Биохимический состав пчелиного меда

Мёд - это сиропообразная, густая, сахаристая жидкость, собираемая пчелами с цветков медоносных растений, переработанная и сложенная в соты в качестве кормовых запасов [2]. Мед широко используется в качестве лекарственного средства. Он способен проявлять такие свойства,

как противомикробные, усиление обмена веществ, благоприятное влияние на сердечно-сосудистую и нервную системы, тонизирующее и противовоспалительное действие. Данные эффекты продукта характеризуются наличием в нем глюкозы, которая благодаря высокой питательности повышает защитную функцию печени и иммунную систему организма. Если в меде обнаружены какие-то примеси его лечебные свойства снижаются. Мед является незаменимым продуктом для здоровья человека, т.к. содержит от 100 до 455 различных жизненно необходимых веществ и соединений [5].

Химический состав мёда зависит от многих факторов: источника нектара, географического места произрастания растения, времени получения, породы пчел, зрелости меда, погодных климатических условий. В мёде обнаружено около 300 различных компонентов, 100 из них являются постоянными и представлены в каждом виде.

Составные части пчелиного мёда (в процентах):

- глюкоза, фруктоза – 65-80%;
- полисахариды – до 4% ;
- азотистые вещества – от 0,04 до 1,56%
- зольные вещества – от 0,02 до 0,8 % :при сжигании меда они остаются в виде золы, в составе которых находят железо, марганец, серу, фосфор, калий, кальций;
- витамины – 0,5- 6,5% (на 100 г меда);
- вода – 15-20%;
- органические кислоты - яблочная, лимонная, молочная, щавелевая около 0,1%
- красящие и ароматические вещества, придающие мёду тот или иной цвет и запах, а также ферменты (количество их так мало, что даже не выражается в весовых или процентных единицах). В меде также присутствуют мальтоза, трегалоза и другие углеводы [10;29].

1.3 Иммуностимулирующие препараты

Иммуномодуляторы – лекарственные средства, которые обладают иммуностроительной активностью, восстанавливают функции иммунной системы (эффективную иммунную защиту) при употреблении их в терапевтических дозах [36; 52; 53]. Наиболее распространенной и удобной классификацией иммуномодуляторов по происхождению является та, которую разработал ГНЦ «Институт иммунологии». Исходя из нее препараты делятся на:

1. эндогенные;
2. экзогенные;
3. синтетические;

К настоящему времени иммунорегуляторные пептиды эндогенного происхождения применяются в качестве иммуномодуляторов:

- Цитокины, интерфероны и эффекторный белок иммунной системы (иммуноглобулины).
- Препараты тимуса влияющие на Т-лимфоциты: тималин, берафор, виллозен, тимоген, тимотропин, Т-активин (тактивин), тимостимулин, тимоптин.

В России освоен выпуск двух рекомбинантных интерлейкинов: Ронколейкина и Беталейкина.

Ронколейкин - рекомбинантный интерлейкин-2 человека (ИЛ-2), продуцирующийся в организме Т-лимфоцитами хелперами и выполняет огромную роль в процессе развития и инициации иммунного ответа [49].

Препарат активирует пролиферацию Т-лимфоцитов, затем они превращаются в цитотоксические и киллерные клетки, способные уничтожать малигнизированные клетки и разного рода патогенные микроорганизмы. ИЛ-2 усиливает образование иммуноглобулинов В-клетками, активизирует функцию моноцитов и тканевых макрофагов [45; 46; 47].

Беталейкин - рекомбинантный интерлейкин-1 бета человека (ИЛ-1). Продукция ИЛ-1 осуществляется преимущественно моноцитами и макрофагами. Его синтез начинается в ответ на поступление в организм например микроорганизмов или при повреждении тканей, вследствие чего запускается комплекс защитных реакций, составляющих первую линию обороны организма. Одно из важных свойств ИЛ-1, состоит в способности стимулировать функции и увеличивать число лейкоцитов. Беталейкин повышает уровень продукции интерлейкинов и интерферонов, число тромбоцитов, выработку антител, ускоряет репаративные процессы в поврежденных тканях [12].

Вторичные иммунодефицитные состояния являются показанием к применению Беталейкина в качестве иммуностимулятора, развивающиеся после тяжелых травм в результате гнойно-деструктивных и гнойно-септических процессов, после больших хирургических вмешательств, а также при хронических септических состояниях.

К иммуностимуляторам экзогенного происхождения относятся препараты бактериального и грибкового происхождения [54] Все они обладают способностью усиливать функциональную активность макрофагов и нейтрофилов.

Первым препаратом, который разрешили к медицинскому применению в качестве иммуностимулятора, стала вакцина БЦЖ, которая обладает выраженной способностью усиливать факторы как приобретенного, так и врожденного иммунитета. Иммуномодуляторы микробного происхождения условно можно разделить на 3 поколения.

К микробным препаратам первого поколения относятся такие лекарственные средства, как пирогенал и продигиозан, представляющие собой полисахариды бактериального происхождения.

Самым выраженным и важным эффектом продигиозана является то, что он проявляет неспецифическое повышение стойкости организма к инфекциям [44]. Кроме этого при генерализованных инфекциях данный

препарат оказывает действие при локальных гнойно-воспалительных процессах, повышает скорость ликвидации инфекции, ускоряет рассасывание воспалительного экссудата, заживление поврежденных тканей, продуктов некротического распада, способствует восстановлению функций органов.

Пирогенал – препарат, вызывающий кратковременную (несколько часов) лейкопению, сменяющуюся лейкоцитозом, а также повышает фагоцитарную функцию лейкоцитов.

Клиническая область использования пирогенала как средства неспецифической иммуностимулирующей терапии - хронические инфекционно - воспалительные заболевания, терапия туберкулеза (вместе с антибактериальными препаратами), ускорение закрытия полостей распада у больных, у которых туберкулез легких выявлен на начальной стадии. Наибольшую активность отмечают при инфильтративной и кавернозной форме туберкулеза легких. Применение пирогенала в онкологии показывают экспериментальные наблюдения: препарат усиливает противоопухолевую активность лучевой и химиотерапии, снижает прививаемость и задерживает рост опухоли [50].

К микробным препаратам второго поколения относятся лизаты например такие как, Бронхомунал, ИРС-19, Имудон, Бронхо-Ваксом и Рибомунил (рибосомы бактерий), относящихся в основном к числу возбудителей респираторных инфекций: клебсиелла пневмонии, стрептококк пневмонии, палочка Пфейффера и другие.

Данные препараты имеют двойное назначение: вакцинирующее (специфическое) и иммуностимулирующее (неспецифическое).

Тактивин стал родоначальником тимических препаратов первого поколения в России, который представляет собой комплекс пептидов, выделенных из тимуса крупного рогатого скота.

Иммуностимулирующие препараты синтетического происхождения производят исключительно химическим путем. Другое название лекарств

этой группы – химически чистые иммуномодуляторы. Список препаратов включает в себя два больших подкласса, что определяется, прежде всего, особенностями строения молекулы действующего вещества.

Новый препарат полиоксидоний совмещает антитоксическое и иммуностимулирующее действие, связанное с полимерной природой препарата. Применяется при хронических инфекционных заболеваниях любой этиологии, во время химиотерапии опухолей, для снижения нефро- и гепатотоксического действия лекарств.

Арбидол, амизон, циклоферон, амиксин, неовир, гропринозин являются мощными индукторами интерферона.

1.4 Апитерапия

1.4.1 Медико-биологические свойства меда.

Впервые антибактериальные свойства меда были описаны Ван Кетелем (1892). Бактерицидное и бактериологическое действие обусловлено несколькими факторами, одним из которых является ингибин. Исследования его происхождения показали, что данным веществом является перекись водорода – H_2O_2 , которая в свою очередь получается из глюкозы в результате воздействия секрета фарингиальной железы пчелы, глюкозооксидазы с участием кислорода. При окислении глюкозы образуется глюконолактон, переходящий затем в глюконовую кислоту, и перекись водорода. Установлена прямая корреляция между количеством перекиси водорода в меде и его антимикробной активностью.

Также одним из бактерицидных факторов отмечают фитонциды, к которым относится бензойная кислота, также обнаруженная в меде [11]. Фитонцидами являются и такие вещества, как джуглон, авенацин, пиносульфан, флоридзин, танины и другие, которые собирают пчелы и откладывают в свои продукты. Благодаря антимикробным свойствам, мед

способствует нормализации микрофлоры полости рта и кишечника при развитии дисбиоза.

Белки, выделяемые пчёлами, при создании оптимальных условий развития семьи пчелы оказывают разные функции. Источником белков медоносных пчёл являются гипофарингеальные, мандибулярные и слюнные железы. В этих железах содержится огромное множество белков и пептидов, выполняющие роль в кормлении расплода, в образовании пыльцевых ножек и перги, а также в образовании мёда из нектара [52].

При употреблении пчелиного меда следует учесть, что противомикробное действие понижается под влиянием желудочного и кишечного сока [38]. Поэтому, чтобы получить эффект при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, необходимо производить его употребление внутрь в виде гипертонического раствора. Следует предварительно принимать раствор пищевой соды или принимать мед с молоком для нейтрализации кислой реакции желудочного сока.

При попадании в желудок мед губительно действует на такой микроорганизм, как *Helicobacter pylori*, который является одним из факторов развития язвенной болезни желудка.

Наблюдениями С. Младенова было установлено, что употребление на протяжении 20 дней меда в суточной дозе 120 г увеличивает фагоцитарную активность лейкоцитов. Также об этом свидетельствуют исследования, проведенные автором на животных, о повышении резистентности организма при длительном употреблении меда.

Д. С. Джарвис считает, что мед в сотах обладает десенсибилизирующим действием при использовании внутрь и местном применении. Предполагается, что в сотовом меде, и особенно в воске, используемым для построения крышечек сотов, содержатся вещества-антиаллергены, которые вырабатывают пчелы. Их химическая природа пока не определена.

Десенсибилизирующие свойства меда возможно связаны с его антитоксической активностью. Известно, что сахара, которые поступают с медом, оказывают антитоксическое действие.

Совокупность компонентов оказывает влияние и на сердечно-сосудистую систему. Мед уменьшает вязкость крови, улучшает питание сердечной мышцы, способствует расширению коронарных сосудов, обладает мягким гипотензивным эффектом в комбинации с соками моркови, хрена и лимона [29].

1.4.2 Медико – биологическая активность маточного молочка.

В опытах *in vitro* выявлено бактерицидное действие маточного молочка [56]. Маточное молочко обладает антиоксидантными свойствами [8], снижает перекисное окисление липидов, оказывая этим гиполитическое действие, приводящее к нормализации липидного спектра крови. Это уменьшает риск развития атеросклероза, гипертонии, инсульта и инфаркта миокарда [17;4]. Маточное молочко способствует расширению мелких кровеносных сосудов, что приводит к нормализации микроциркуляции крови в тканях органов, прежде всего в миокарде [16]. Кроме того, маточное молочко, благодаря своим адаптогенным свойствам, повышает устойчивость к физическим и психическим нагрузкам. Этот продукт стимулирует деятельность системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники, обладает регенерирующим, антисептическим и иммуномодулирующим свойствами.

Маточное молочко является биостимулятором, приводит в норму обмен веществ в организме, усиливает активность ферментов, улучшает трафик тканей, регулирует клеточное питание, тонус сосудов, гормональную деятельность, способствует снятию ангиоспазма, снижает уровень холестерина и триглицеридов в крови, корректирует баланс электролитов и катехоламинов в тканях стенок сосудов. Оно богато биологически активными веществами, необходимых для нормализации

гормональных и ферментативных функций, относится к иммунорегуляторным модуляторам, стимулирует кроветворение, защитные функции организма, повышает его выносливость, ускоряет выведение ядов, обладает противорадиационными свойствами [4;18; 51; 55].

1.4.3 Медико – биологическая активность трутневого расплода

Как трутневый расплод, так и маточное молочко повышают уровень метаболизма в период активной мышечной деятельности животных, благодаря чему возрастает их физическая выносливость [7; 25].

Трутневый расплод обладает выраженным гонадотропным эффектом, по абсолютным значениям, превосходящим маточное молочко. Он способствует ускоренному восстановлению биохимических показателей (концентрации тестостерона в крови и фруктозы в жидкости семенных пузырьков) у самцов крыс с односторонней кастрацией. Это объясняется более высоким содержанием стероидных гормонов в расплоде [7].

Известно, что в медицине Китая, Японии и других стран трутневый расплод применяют как стимулятор развивающегося организма детей, а также при лечении органов пищеварения и психических расстройствах [35].

Выраженная биологическая активность трутневого расплода предопределяет целесообразность дальнейшего исследования биохимических свойств данного продукта.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве материала для исследования использовался гомогенат трутневого расплода, приготовленный на 0,9% растворе NaCl. После чего хранился в морозильнике для дальнейших исследований.

Также в качестве материала в своих методах я использовала мед и пергу. Раствор меда готовила с концентрацией 20%, после чего образец подвергался заморозке для дальнейшего использования как и другие биоматериалы.

2.1 Метод определения содержания белка методом Лоури

Метод Лоури – метод основанный на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина (фосфомолибденовая кислота и фенол) в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи [26]. В моей работе он использовался для определения количественного содержания белка в изначально приготовленных растворах материалов исследования, а также для фракций собранных после ионообменной хроматографии.

Из каждой фракции отбиралась аликвота объемом 0,5 мл, к этому прибавлялся 1 мл реактива С (реактив В (0,5%-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м растворе тартрата или цитрата натрия + реактив А (2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH) в соотношении 50:1), смесь перемешивалась и инкубировалась в течение 10 минут при комнатной температуре. После чего добавлялся реактив Фолина в объеме 100 мкл, затем смесь снова интенсивно перемешивалась и инкубировалась при комнатной температуре в течение 40 минут [9].

На фотоэлектроколориметре КФК-3 проводилось измерение оптической в кювете толщиной 1 см против контрольной 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.

2.2 Метод определения концентрации углеводов

Реакция Селиванова является качественной для определения кетоз, в данном случае проверяла на наличие углеводов.

Принцип реакции: при нагревании фруктозы или других кетоз с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол, образующий с резорцином соединение (продукт конденсации), окрашенное в вишнёво-красный цвет.

Порядок проведения работы: из каждой фракции после ионообменной хроматографии отбиралась аликвота объёмом 0,5 мл, к которой прибавляется 0,1%-й спиртовой раствор резорцина объёмом 0,5 мл и 1,5 мл 30% HCl, после чего смесь ставится для инкубации на 8 минут в кипящую водяную баню. Интенсивность окраски измерялась на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете толщиной 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 490$ нм. По полученным значениям адсорбции был составлен график.

2.3 Гель-фильтрация и подготовка колонки

Подготовка геля: Сефадекс G-25 оставляли для набухания на 3 часа будучи суспендированным в 5-10 кратном объеме дистиллированной воды. После чего перемешивали и давали отстояться. Затем осторожно отбирали надосадочную жидкость с неосевшими обломками гранул. Суспендирование и последующее удаление лишней воды повторяли 3-4 раза.

Заполнение колонки. Колонку закрепили в вертикальном положении, нижнее отверстие которой закрыли резиновой пробкой со вставленным

фитингом, предварительно поместив в основание колонки кружок фильтровальной бумаги. Залили 2 мл NaCl, дали заполниться фитингу и производили заполнение колонки гелем, наливая густую смесь по стеклянной палочке. Открыли зажим колонки и дали раствору свободно вытекать, следя за тем, чтобы столбик геля находился над слоем раствора. Суспензию геля прибавляли до того уровня, когда его высота в колонке не достигла нужного уровня. Затем на поверхность геля поместили кружок фильтровальной бумаги. Колонку промыли (уравновесили) раствором 0,9% NaCl.

Определение рабочего объема 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 элюиционного объема рибофлавина и голубого декстрана измеряли оптическую плотность элюата на КФК-2 при длине волны 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. Внутренний объем колонки нашли как разность между объемом элюции рибофлавина и свободным объемом, который составил 11 мл [31].

2.4 Метод ионообменной хроматографии

Данный метод хроматографии в частности используется на первой стадии очистки белков из гомогенатов либо из другой смеси. Он позволяет разделять полярные молекулы и ионы, на основании зарядов разделяемых молекул [24].

Принцип ионообменной хроматографии заключается в том, что молекулы веществ в растворе способны диссоциировать на анионы и

катионы, которые при дальнейшем движении через сорбент разделяются за счет различной скорости обмена с ионными группами сорбента [34].

Неподвижной фазой в данном методе является большое количество ионогенных групп, которые привязаны к поверхности гранул или пор ионообменника. Подвижной основой является элюент, зачастую он приготовлен на водной основе.

Ионообменники делятся на сильные и слабые, в зависимости от характера сорбции и рабочего диапазона pH. Распространённые функциональные группы анионитов и катионитов представлены в таблице 1,2.

Таблица 1.

Распространенные ионогенные группы сильных и слабых анионитов.

Формула	Название	Обозначение
Сильные		
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Триметиламинометил-	ТАМ-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	Триэтиламиноэтил-	ТЕАЕ-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Диэтил-2-оксипропил-аминоэтил-	QAE-
Слабые		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	Аминоэтил-	АЕ-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Диэтиламиноэтил-	DEAE-
$-(\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_2)_n\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	Полиэтиленимин-	PEI-
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+\text{H}_3$	Парааминобензил-	РАВ-

Таблица 2.

*Распространенные ионогенные группы сильных и слабых
катионитов.*

Формула	Название	Обозначение
Сильные		
-PO ₃ H	Фосфо-	P-
-SO ₃	Сульфо-	S-
-CH ₂ SO ₃	Сульфометил-	SM-
-C ₂ H ₄ SO ₃	Сульфоэтил-	SE-
-C ₃ H ₆ SO ₃	Сульфопропил-	SP-
Слабые		
-COO	Карбокси-	C-
-CH ₂ COO	Карбоксиметил-	CM-

Подготовка ионообменников к работе. Навеску ионообменника массой 3 г заливают в 50-кратном объеме дистиллированной воды и оставляют на сутки для набухания. После 24 часов набухания проводят несколько раз взмучивание ионообменника и дают осесть гранулам целлюлозы. К оставшемуся осадку приливают 0,5н раствор NaOH в 50-кратном объеме. После тщательного перемешивания через час фильтруют через воронку Бухнера. Получившийся осадок промывают водой. Затем ионит перемешивают в 50-кратном объеме 0,5н. HCl и через 30-60 мин (время обработки ионита кислотой не должно быть большим) отмывают дистиллированной водой примерно до pH 5,0. На следующем этапе в случае анионитов (например, ДЭАЭ – целлюлозы) повторной обработкой щелочью переводят в OH⁻ форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном объеме 0,5н. NaOH, перемешивают и через час отмывают дистиллированной водой до pH воды. В случае катионитов (например, КМ – целлюлозы) сорбент повторной обработкой кислотой переводят в H⁺

форму. Для этого его суспендируют в 50 – кратном избытке 0,5 раствора HCl в течение 30-60 мин. После фильтрования сорбент отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока pH промывной жидкости не достигнет pH воды [28].

2.5 Метод тангенциальной ультрафильтрации

Ультрафильтрация – процесс мембранного разделения, концентрирования и фракционирования веществ, который осуществляется путем фильтрования жидкости из-за разности давлений до и после мембраны [6].

Данную работу проводили на установке Vivaflow, которая позволяет в тангенциальном потоке проводить очистку белков и других высокомолекулярных соединений с дальнейшей возможностью их концентрирования.

По своей разделительной способности данный метод уступает гелефильтрации по той причине, что позволяет получать две фракции («более крупные молекулы» и «более мелкие молекулы»). Однако ультрафильтрация имеет ряд преимуществ: высокая скорость фильтрации, концентрирование веществ, неоднократное использование мембраны для фильтрации.

Замедление ультрафильтрации происходит в том случае, когда повышается концентрация белка, поэтому, прежде чем собрать удерживаемый раствор, необходимо несколько раз разбавить концентрируемый раствор буфером [27].

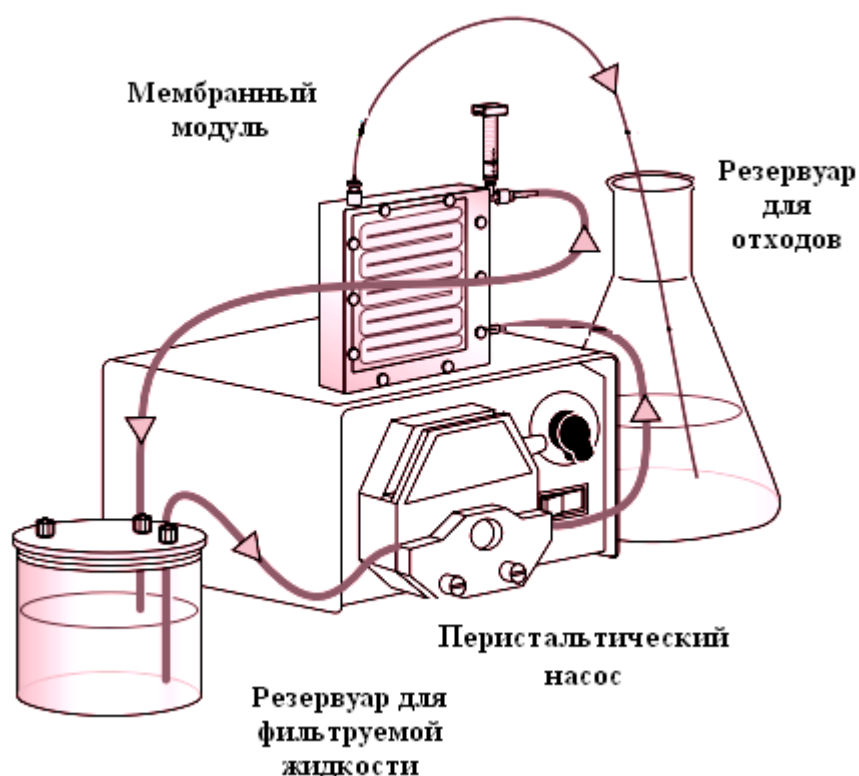


Рис. 1. Установка Vivaflow для тангенциальной ультраfiltrации

2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография

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

2.7 Лиофилизация

Лиофилизация – это один из способов высушивания биологических или пищевых продуктов, и других влагосодержащих объектов, которые предварительно подвергаются сильной заморозке, после чего помещаются в вакуум. В данном процессе вся жидкость удаляется из замороженного объекта методом испарения льда.

При удалении влаги из продукта, в процессе лиофилизации, структура белка практически не нарушается, но в самом продукте резко прекращаются всякие биохимические реакции. После чего сам продукт имеет сильную защиту перед факторами внешнего воздействия среды и сохраняет свои изначальные свойства в течение длительного времени. Именно поэтому лиофилизированные закваски VIVO способны выдержать температуру до 30 градусов в течение 10 суток. Препараты, прошедшие процесс лиофилизации хорошо растворяются в воде, после чего восстанавливают свои прежние свойства [40].

2.8 Тестирование препарата на иммуотропность

2.8.1 Приготовление препарата

Пробы анионных пептидов, собранные из раствора меда и гомогената трутневого расплода, представляют собой фракции собранные за несколько этапов ионообменной хроматографии слитые вместе. Концентрация пептидов в данных пробах оказалась невысокой для проведения тестов, после чего образцы были направлены на лиофилизацию.

2.8.2 Метод исследования

Исследования возможной иммуотропности препарата проводили в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств Министерства здравоохранения и социального

развития РФ, разработанного в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» [20].

Таблица 3.

Группы испытуемых особей.

Количество испытуемых особей	Введенный препарат, доза
6	Интактная группа
6	Группа А – контрольная группа (цитратный буферный раствор)
6	Группа Б – препарат раствора меда 300 мкг/мл + культура E. coli
6	Группа В – препарат раствора трутневого расплода 300 мкг/мл + культура E. coli
6	Группа Г – препарат раствора перги 300 мкг/мл + культура E. coli
6	Группа Д – культура E. coli

Белые крысы одного пола были разделены на несколько групп: Каждой испытуемой особи из групп Б, В, Г внутрибрюшинно вводился препарат с заданной концентрацией пептидов в объеме 0,2 мл На-цитратного буферного раствора (рН = 6), через 48 часов производилось внутрибрюшинная инъекция чистой культуры *Escherichia coli* в объеме 0,2 мл с концентрацией 1 млрд. клеток в 1 мл. Группе Д культура патогена вводилась одновременно с другими группами. Крысы получали одинаковое питание, находились в одинаковых условиях. Наблюдение за испытуемыми ведется в течение 10 дней.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение фракций низкомолекулярных пептидов методом гель-фильтрации раствора гомогената трутневого расплода

Перед тем как получить фракции низкомолекулярных пептидов, раствор исследуемого материала наносили в объеме 0,5 мл, будучи осажденным 10% раствором ТХУ. В качестве элюирующего раствора выступала дистиллированная вода. После чего были собраны фракции объемом 1,5 мл, а затем с набранным материалом проводили метод Лоури для определения количества белка, оптическую плотность фракций на фотоэлектроколориметре КФК-3 при длине волны $\lambda = 750$ нм.



Рис. 2. Профиль элюции пептидов 20% раствора трутневого расплода

Были сделаны расчёты молекулярной массы вышедших пептидов и выяснилось, что первый пик представлен пептидами, вышедшими в свободном объеме, с молекулярной массой 4,786 кДа, второй и третий — 3,895-4,219 кДа, а четвертый пик представлен пептидами с молекулярной массой 3,491 кДа. Данные подсчеты были сделаны благодаря пропусканию

через колонку растворов – свидетелей, таких как рибофлавин и трипсин-ингибитор.

3.2 Получение фракции пептидов с молекулярной массой до 10 кДа из растворов пчелопродуктов методом ультрафильтрации

Для работы на установке Vivaflow 200 необходимо было провести подготовительную работу. Для чего была налита дистиллированная вода в объеме примерно три четверти в резервуар и запустили перистальтический насос, так как поверхность мембраны должна очиститься молекулами воды от возможных остатков прошлых фильтраций. По мере того как происходит уменьшение объема воды до одной пятой объема резервуара проводили смену промывающего раствора на 0,5 н NaOH для омыления трудноотмываемых частиц. После чего мембрана и все трубки были также промыты дистиллированной водой для избавления от каких-либо посторонних примесей. После проделанных операций установку можно использовать по назначению.

Ультрафильтрацию проводили на мембранном модуле Vivaflow 200 из ПЭС с отсекающей молекулярной массой 10 кДа. Для этого 200 мл 10% раствора меда помещали в герметичную емкость и прокачивали через мембрану под давлением 2,5 бар (0,25МПа) со скоростью 200-400 мл/мин. Скорость снижали при достижении получаемого концентрата объемом 20 мл до 20-40 мл/мин и рециркулировали сконцентрированный раствор около двух минут для повышения выхода продукта.

После проведения работ на данной установке ультрафильтрации были получены фракции биологически активных веществ меда с молекулярной массой до 10 кДа, но помимо содержащих там пептидов, находятся также и углеводы, для устранения которых использовали метод ионообменной хроматографии на разных типах ионообменников, позволяющий разделить пептиды мёда по заряду молекул. Углеводы

вместе с несвязавшимися пептидами будут выходить в свободном объеме колонки.

Затем по такому же принципу была проведена работа с 20% раствором перги в объеме 200 мл.

3.3 Ионообменная хроматография

3.3.1 Анионообменная хроматография

Последовательное разделение пептидов методом ионообменной хроматографии проводилось в одинаковых условиях. Исходя из работ прошлых лет было видно, что при нанесении большего объема уменьшался выход пептидов, по сравнению с меньшим объемом наносимого образца. Опираясь на данную информацию, объем, наносимый на колонку, исследуемого образца составил 0,35 мл. После чего были собраны фракции объемом 1 мл, а затем с собранным материалом проводили метод Лоури для определения количества белка, оптическую плотность фракций на фотозлектроколориметре КФК-3.

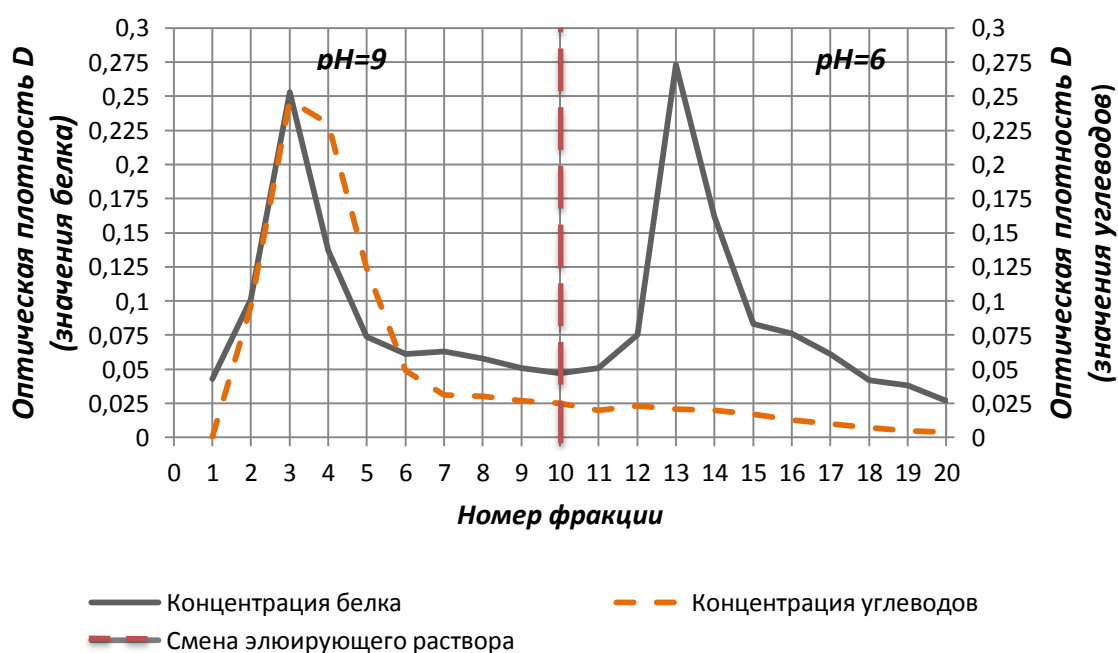


Рис. 3. Профиль элюции пептидов меда при анионной хроматографии, объем наносимой пробы — 0,35 мл (дополнительная ось в масштабе белка)

Как видно из профиля элюции пептидов меда на DEAE-целлюлозе, первый пик представлен положительно заряженной группой веществ, которая не сорбировалась на анионообменном носителе, второй пик – отрицательно заряженные пептиды, которые сорбировались на анионообменном носителе и были отделены от него благодаря изменению pH элюирующего буфера в более кислую область.

3.3.2 Катионообменная хроматография

При катионообменной хроматографии колонку уравнивают начальным буферным раствором (Na-ацетатный буферный раствор с концентрацией 0,2 М и pH = 4,2). Фракции собирали по 1 мл, после сбора девятого образца проводили смену элюента на 0,2 М трис-HCl буферный раствор при pH = 9. Разделение осуществляли в тех же условиях, что и при анионообменной хроматографии (объем носителя, объем фракции и скорость элюции). Использование двух буферных растворов для десорбции катионных пептидов вместо одного объясняется более эффективным разделением катионных пептидов в зависимости от их заряда.

По такому методу разделения не происходит сорбция углеводов в связи с чем, они выходят в свободном объеме колонки с несвязавшимися пептидами. После каждой смены буферных растворов четко видны пики, свидетельствующие о том, что в мёде содержится две разных группы пептидов. Причём катионные пептиды являются самыми малочисленными. Помимо низкомолекулярных пептидов, видно также присутствие в растворе углеводов, максимальная концентрация которых достигается в четвертой фракции.

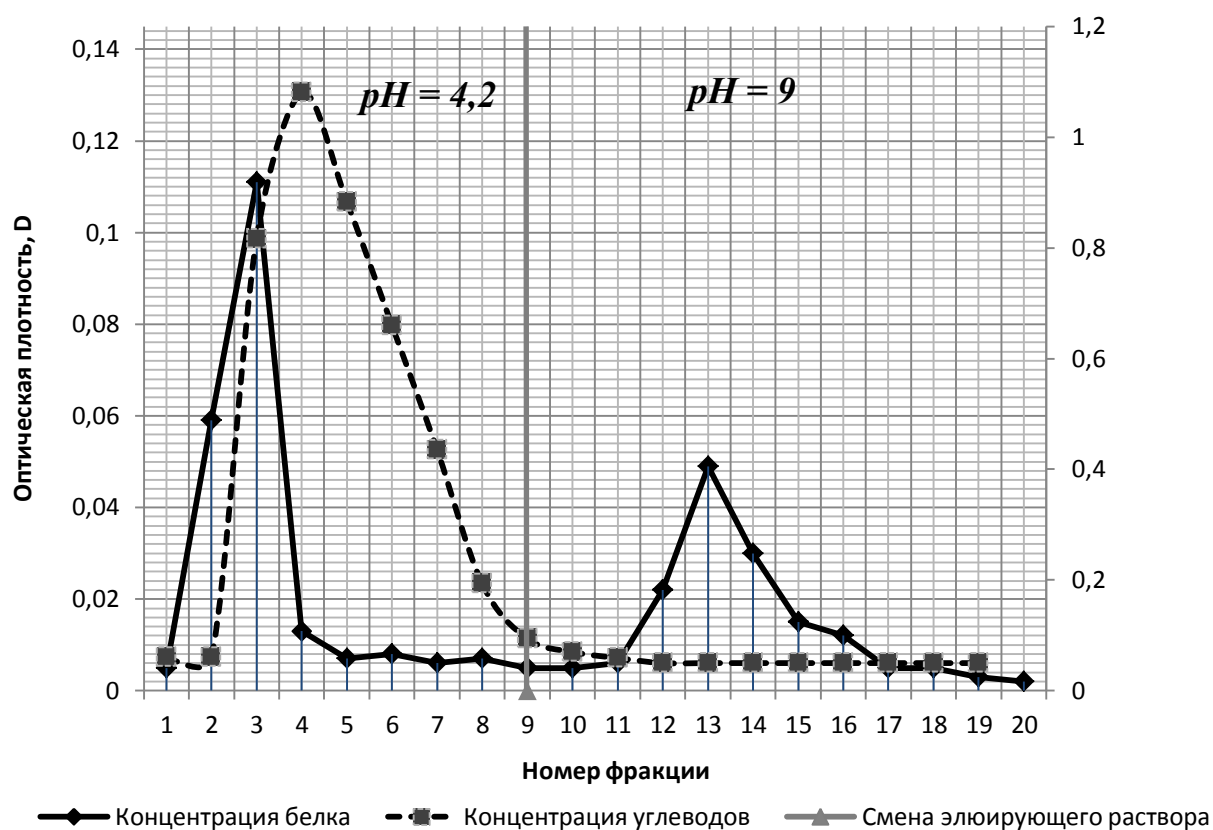


Рис. 4. Профиль элюции пептидов раствора пчелиного меда при катионной хроматографии (дополнительная ось показывает смену буфера, 200 мкл)

Раствор перги 20 % пропускали через катионную хроматографию по такому же принципу как описано выше. Исследуемый материал наносили в объеме 0,15 мл. Собирали 25 фракций по 1 мл. После чего проводили определение на количественное содержание белков методом Лоури [49] и на содержание углеводов использовали реакцию Селиванова.

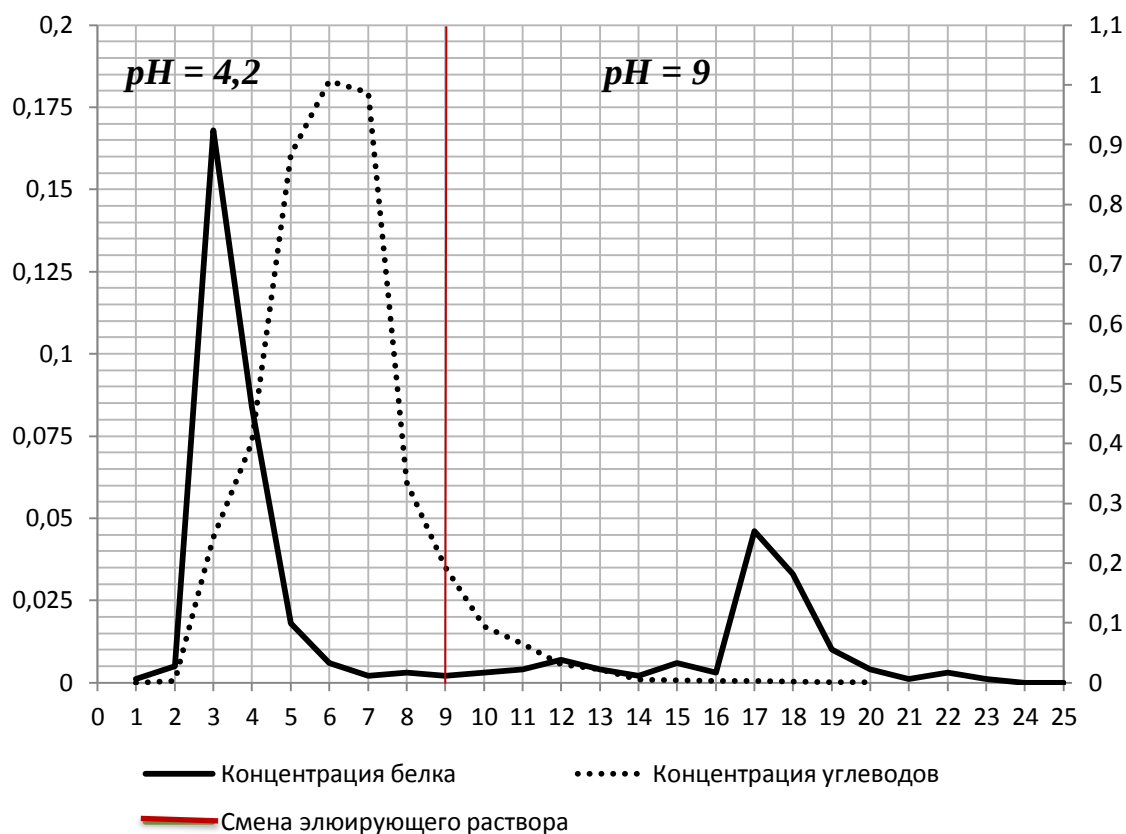


Рис. 5. Профиль элюции пептидов из 20% раствора перги при катионной хроматографии (дополнительная ось показывает смену буфера, 150 мкл).

3.4 Анализ спектра анионных и катионных пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для анализа на ВЭЖХ использовались фракции, в которых была выявлена концентрация искомым пептидов, слитые в одну. Соответственно, для анионных пептидов это были фракции под номером 13, 14 и 15, а для анализа пептидов после катионообменной фракции под номером 12, 13 и 14. Предварительно подготовленные образцы анализируемых растворов пропускались через хроматограф с целью дополнительно разделить общие группы анионных и нейтральных пептидов. Для каждого чётко выраженного пика на хроматограмме определялись параметры, характеризующие каждое вещество (или группы веществ), на которое этот пик указывает: Время удерживания (время от

момента ввода анализируемой пробы до момента максимума хроматографического пика) и относительная площадь пика от суммы площадей всех пиков. Качественной характеристикой вещества является время удерживания, а последний параметр позволяет дать примерную характеристику между концентрациями схожих пиков. Для полноты информации в таблицу были добавлены также и дополнительные параметры, такие как: объём подвижной фазы (объём в миллилитрах, который затрачивается на элюцию вещества от начала его выхода до максимума) и высота пика (в единицах оптической плотности).

Благодаря тому, что известна исходная концентрация пептидов вводимой пробе, а также относительная площадь каждого пика, простейший математический расчёт позволяет узнать абсолютную концентрацию каждого пика:

$$x = (a/100) \cdot RA,$$

где x — искомая абсолютная концентрация, a — исходная концентрация в образце, RA — относительная площадь пика (*Relative Area*).

Все выше обозначенные параметры пиков после хроматографии пептидов, разделённых методом анионной хроматографии, занесены в таблицу №4. В таблицу №5 занесены те же параметры, но характеризующие хроматографическое разделение пептидов после катионообменной хроматографии. На хроматограмме анионных пептидов можно с уверенностью выделить три чётких пика: на рисунке 6 они под номерами 5, 6 и 9. На хроматограмме (рисунок 7) разделения катионных пептидов видны три чётких пика №3, 4, 5 и 7, также к ним можно добавить минорный пик под номером 6.

Таблица 4.

Качественные и количественные характеристики анионных пептидов после ВЭЖХ (исходная концентрация 398,3 мкг/мл)

Номер пика	Время удерживания (TR), мин	Объём подвижной фазы (RV), мл	Высота пика, mAU	Относительная площадь пика (RA), %	Абсолютная концентрация, мкг/мл
5	9,94	2,49	1331	33,38	133,42
6	19,68	4,92	148	4,45	17,79
9	32,12	8,03	239	2,83	11,31

Таблица 5.

Качественные и количественные характеристики катионных пептидов после ВЭЖХ (исходная концентрация 57,4 мкг/мл)

Номер пика	Время удерживания (TR), мин	Объём подвижной фазы (RV), мл	Высота пика, mAU	Относительная площадь пика (RA), %	Абсолютная концентрация, мкг/мл
3	9,74	2,43	825	2,57	11,27
5	19,68	4,92	85	7,03	4,05
7	32,12	8,09	338	15,84	9,12
4	12,43	3,11	28	7,93	4,57
6	27,91	6,98	19	2,62	1,51

Попарное сравнение качественных параметров пиков 5, 6, 9 и 3, 5, 7 (анионные и пептиды после катионообменной хроматографии соответственно) показывает, что это одни и те же вещества, только находящиеся в разной концентрации. Вне зависимости от того, что

абсолютная исходная концентрация в первом случае практически в семь раз больше, чем во втором, относительная площадь пика даёт возможность сравнить их содержание в образце. На Рисунке 14 попарное сравнение изображено в более наглядной форме.

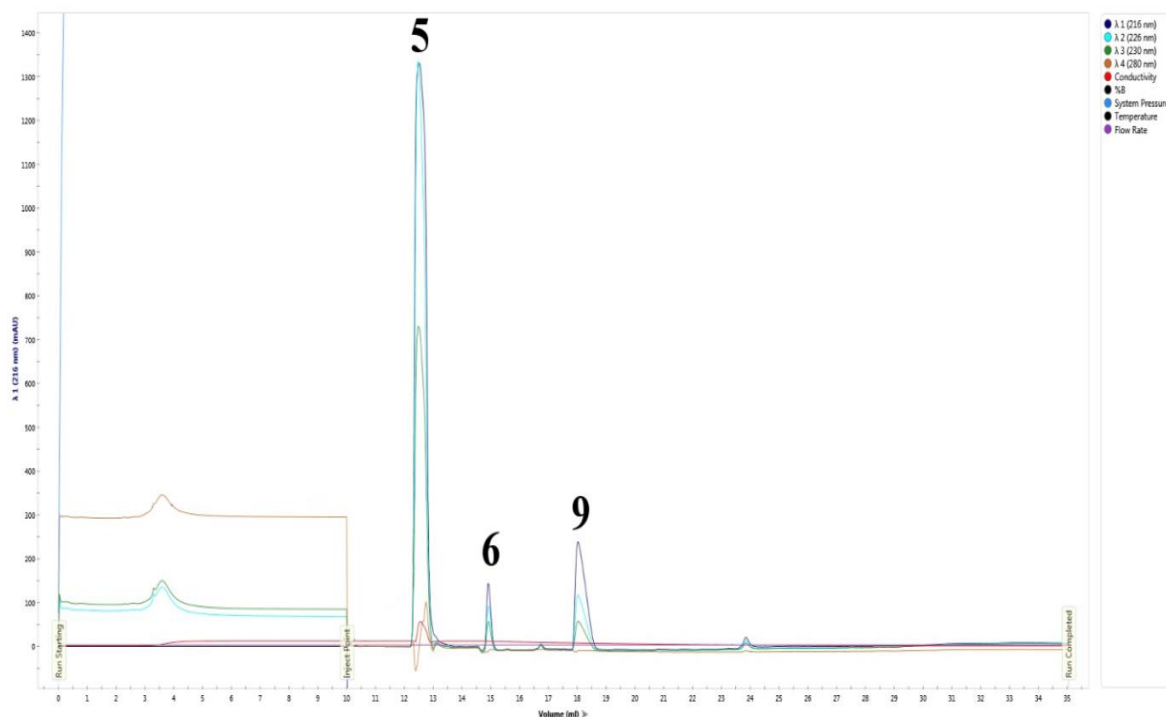


Рис. 6. Хроматограмма разделения анионных пептидов методом ВЭЖХ в градиенте элюента.

На этих графиках каждая пара аналогичных пиков сравнивается по двум признакам: время удерживания (столбцы оттенков синего) и объём подвижной фазы (столбцы оттенков зелёного). Первое значение — анионные пептиды, второе — катионные. Третий тип столбцов, оранжевого цвета, наглядно демонстрирует, что максимальная разница в значениях не превышает 0,8%, что доказывает одинаковый состав этих веществ.

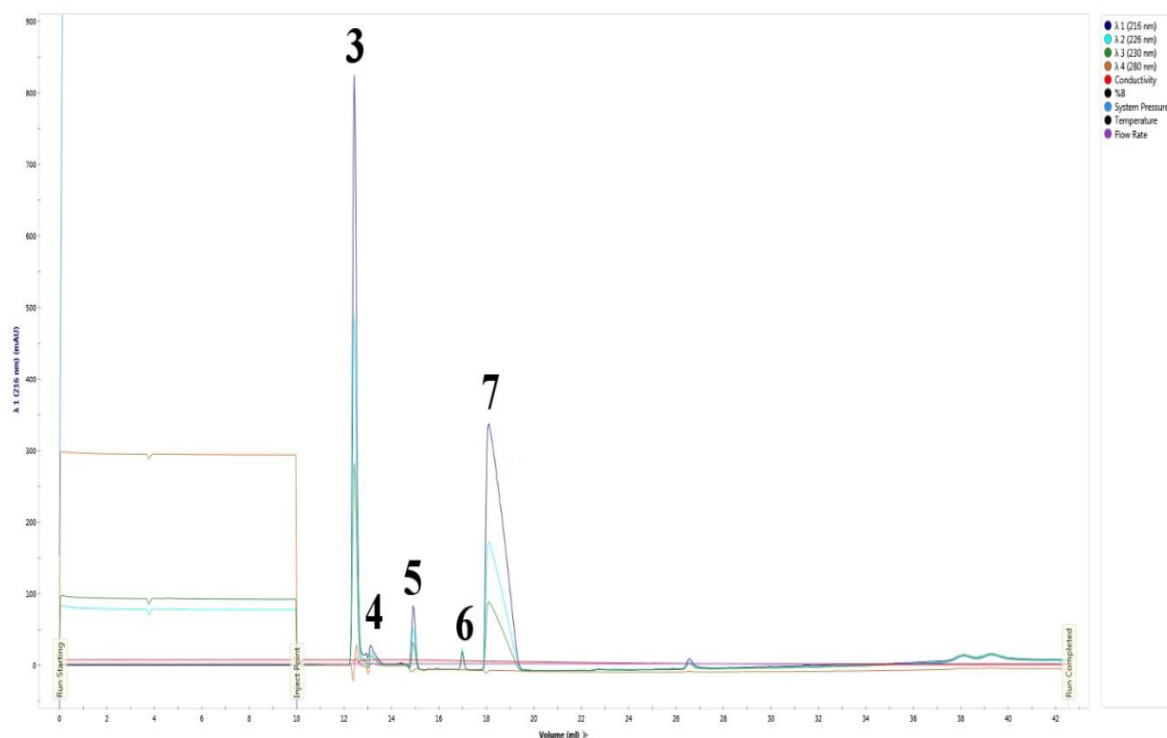


Рис. 7. Хроматограмма разделения катионных пептидов методом ВЭЖХ в градиенте элюента.

На этой диаграмме каждая пара аналогичных пиков сравнивается по двум признакам: время удерживания (столбцы оттенков синего) и объём подвижной фазы (столбцы оттенков зелёного). Первое значение — анионные пептиды, второе — катионные. Третий тип столбцов, оранжевого цвета, наглядно демонстрирует, что максимальная разница в значениях не превышает 0,8%, что доказывает одинаковый состав этих веществ. Но, несмотря на тот факт, что концентрация (относительная) в обоих случаях примерно одинаковая — 40,66 и 42,44 (суммарное значение относительной концентрации трёх пиков для анионных и нейтральных пептидов соответственно), в случае ВЭЖХ после катионообменной хроматографии наблюдается перераспределение относительных концентраций.

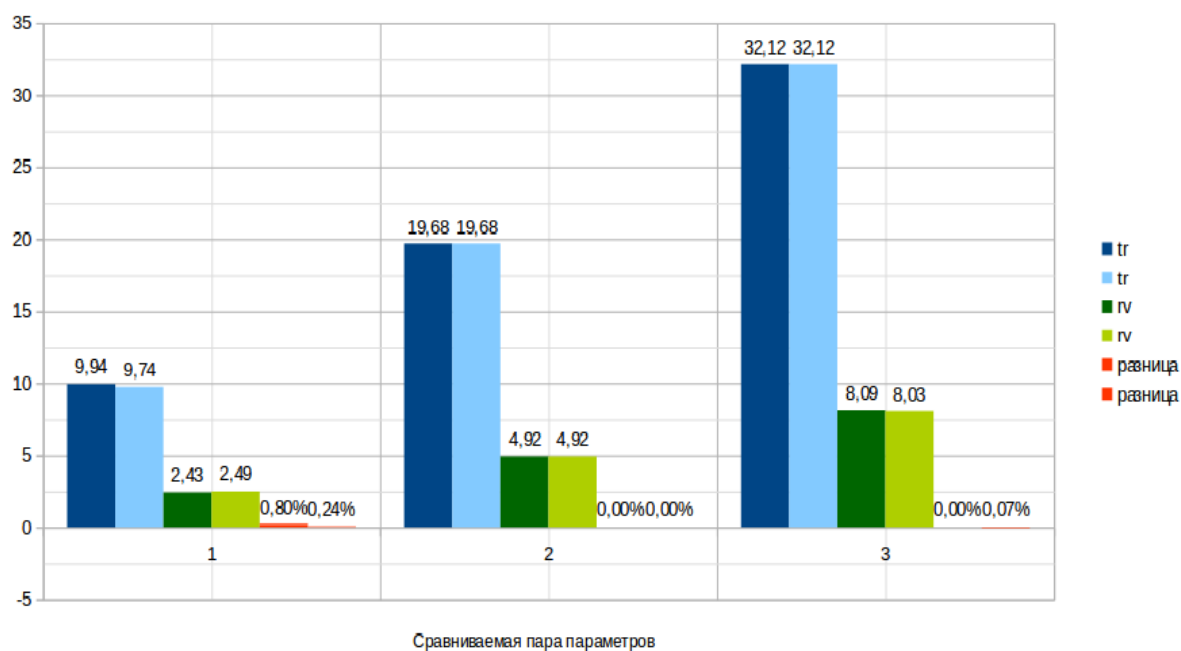


Рис. 8. Попарное сравнение параметров схожих пиков на хроматограмме ВЭЖХ анионных и нейтральных пептидов (*tr* — время удерживания, *rv* — объём подвижной фазы, *разница* — разница между двумя парными параметрами в процентах). Тёмный столбец — пик анионных пептидов, светлый — нейтральных.

В первой паре (пики 5 и 3) уменьшение концентрации нейтральных пептидов 59% раза, во второй паре (пики 6 и 5) концентрация нейтральных пептидов наоборот, выросла на 63%, в третьей паре — пики 9 и 7 — рост составил 560%. Это явление можно объяснить различием в строении ионитов: DEAE-целлюлоза и SE-сефадекс в случае анионной и катионной хроматографии соответственно. Возможно, своё влияние оказывает строение функциональной группы и размер гранул ионита.

На основании тех фактов, что во-первых, пептидные фракции после анионообменной и катионообменной хроматографии в целом схожи, во-вторых, три одинаковых пика на различных хроматограммах имеют примерно одинаковые относительные концентрации можно сказать, что эти группы пептидов не содержат в своём составе заряженных при нейтральных значениях pH аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой, лизина, аргинина и гистидина. Это значит, что при нейтральных значениях

pH эти пептиды имеют нейтральный заряд и не сорбируются на анионообменнике любого типа. При щелочных значениях pH (условия соответствуют значениям водородного показателя на начальном этапе анионообменной хроматографии) такие пептиды имеют отрицательный заряд, а при кислых (как при катионообменной хроматографии) — положительный, что позволяет им закрепляться на ионите. И в том, и в другом случае. В случае разделения с помощью ВЭЖХ пептидной фракции после катионообменной хроматографии появляются дополнительные пики, суммарная относительная концентрация которых не превышает одной четвёртой от таковой общих для катионных и анионных пептидов. Что послужило поводом выбрать для тестирования на иммуностропность первым препарат, в составе которого находятся только анионные пептиды. Также одним из результатов проведения ВЭЖХ с пептидами мёда после разделения на анионите и катионите стало решение далее не использовать метод ионообменной хроматографии для разделения этих пептидов (по крайней мере, в случае с анионной хроматографией), поскольку спектр пептидов, имеющих одинаковые качественные хроматографические характеристики слишком высок.

По такому же принципу был проведен метод ВЭЖХ с пептидами перги, для анализа которых использовались фракции под номерами 17, 18, 19. Разделение проводилось на колонке 4,5 x 150 мм, 5 мкм в системе 0,5 % раствор трифторуксусной кислоты в воде: 0,5 % раствор трифторуксусной кислоты в 50% ацетонитриле в воде.

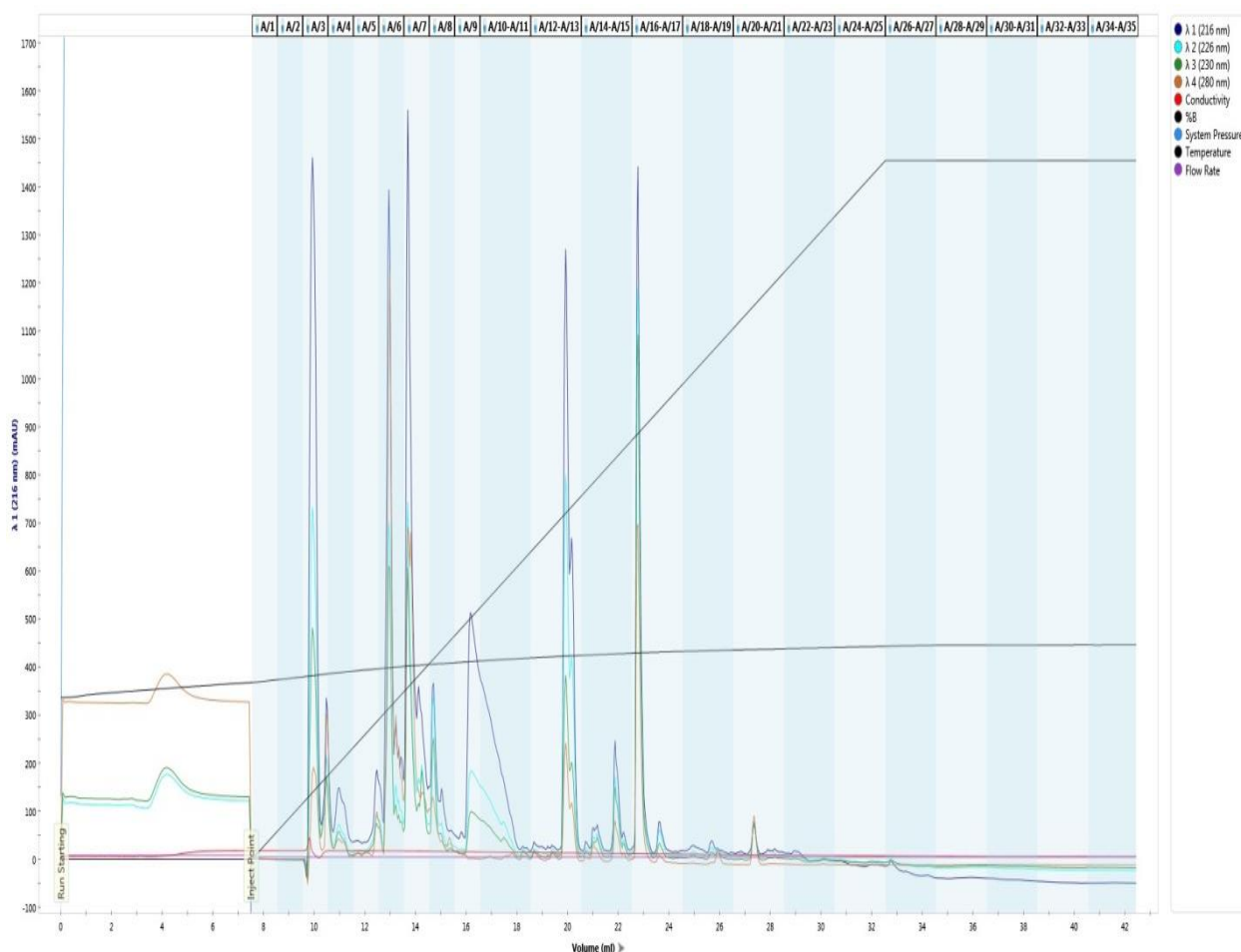


Рис. 9. Профиль разделения пептидов перги методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

3.5 Оценка влияния пептидной фракции пчелопродуктов на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции при моделировании экспериментального сепсиса у крыс

Влияние исследуемых пептидов, полученных из 20% раствора пчелиного мёда, гомогената трутневого расплода и перги, изучали в эксперименте на 36 белых беспородных крысах – взрослые особи. Все животные содержались в стандартных условиях вивария, со свободным доступом к воде и пище. Испытуемые животные были разделены на 6 групп:

Таблица 6.

Схема разделения испытуемых крыс

Количество испытуемых особей в группе	Названия групп	Вводимое вещество
6	Интактная	Ничего не вводилось
6	А, контрольная	Цитратный буферный раствор, pH=6
6	Б	Препарат из раствора меда в концентрации 300мкг/мл + культура E. coli
6	В	Препарат из раствора гомогената трутневого расплода в концентрации 300мкг/мл + культура E. coli
6	Г	Препарат из раствора перги в концентрации 300мкг/мл + культура E. coli
6	Д	Культура E. coli

Через 48 часов группам Б, В, Г была введена культура кишечной палочки в концентрации 1 млрд. клеток/мл. Все инъекции проводились внутрибрюшинно в объёме 0,2 мл. Наблюдение велось на протяжении 10 дней. Результаты теста на выживаемость приведены в таблице 7 и соответствуют критериям, указанным в руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств[20].

Таблица 7.

*Результаты исследования полученных пептидов из растворов
пчелопродуктов на иммунотропность*

Группа	Введенный препарат	Количество выживших	Процент выживаемости
А	Цитратный буфер	6	100%
Б	Пептиды раствора меда	4	67%
В	Пептиды гомогената трутневого расплода	5	83%
Г	Пептиды экстракта перги	3	50%
Д	Культура E.coli	1	16%

Из таблицы видно, что при введении препарата из пчелопродуктов наблюдается достаточно высокая выживаемость испытуемых особей, особенно группы В, в то время как группа Д, содержащая только культуру E.coli, составляет процент выживаемости всего 16%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования показывают выраженный иммуностимулирующий и иммуотропный эффект пептидов из продуктов пчеловодства: из раствора меда, из раствора гомогената трутневого расплода и из экстракта перги.

На основании полученных результатов можно сформулировать следующие выводы:

1. Разработана и апробирована схема выделения иммуностимулирующих препаратов из продуктов пчеловодства
2. Охарактеризованы пептидные спектры продуктов пчеловодства и описаны физико-химические свойства фракций пептидов.
3. Разработан и апробирован способ оценки биологической активности иммуностимулирующего фактора из продуктов пчеловодства, проверка иммуотропного действия этих факторов.
4. Показана иммуностимулирующая активность препаратов пептидов из продуктов пчеловодства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеницер, М. Л. Продукты пчеловодства как биоиндикатор радиоактивного загрязнения окружающей среды / М. Л. Алексеницер, Л. И. Боднарчук, В. П. Кубайчук // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч.-практ. конф. по апитерапии. – Рыбное, 2007. – С. 196-197.
2. Бабина, Н. В. Пчеловодство / Н. В. Бабина. – По материалам зарубежной печати. Мн, 1996. – 448 с.
3. Билаш, Г.Д. Научно-исследовательский институт пчеловодства и апитерапия / Г. Д. Билаш // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч.-практ. конф. по апитерапии. – Рыбное, 1997. – С. 7-14.
4. Боднарчук, Л. И. Противоопухолевые свойства маточного молочка / Л. И. Боднарчук, И. М. Кожура, В. Н. Рябуха // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч.-практ. конф. по апитерапии. Рыбное, 1997. – С. 93-94.
5. Борисова, М. Лечение медом / М. Борисова. – Санкт-Петербург: Литера, 2005 – 64 с.
6. Брок, Т. Мембранная фильтрация / Т. Брок, пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 464 с.
7. Бурмистрова, Л. А. Метаболическая оценка гонадотропного эффекта трутневого расплода / Л. А. Бурмистрова, В. Г. Макарова, А. И. Рябков, К. В. Савилов // Апитерапия сегодня: Сб. 7 Материалы VII научно-практической конференции по апитерапии (Рязань, 3-5 октября, 1999) – Рыбное, НИИ пчеловодства, 2000 – С. 95-97.
8. Галлиновский, С. П. Антиоксидантная терапия продуктами пчеловодства / С. П. Галлиновский // Апитерапия сегодня: Сб. 7–Рыбное, 2000 –с. 79-82.
9. Доусон, Р. Справочник биохимика / Р. Доусон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. — М.: Мир, 1991. — 544 с.
10. Иойриш, Н.П. Продукты пчеловодства и их использование / Н. П. Иойриш. – М.: Россельхозиздат, 1976 – 176 с.

11. Каблуков, И.А. О меде, воске, пчелином клее и их подмесьях / И. А. Каблуков. – 2 изд. – М.: Сельхозгиз, 1941. – 176 с.
12. Конусова, В. Г. Изменение показателей оксидантного и цитокинового статуса больных хроническим вирусным гепатитом С и В при лечении препаратом рекомбинантного интерлейкина 1 β человека / В. Г. Конусова, Е. С. Романова, И. В. Чурилова // Цитокины и воспаление. – 2003. – С.14 - 19.
13. Корж, В.Н. Маточное молочко / В. Н. Корж, В. Е. Малыхин, А. П. Вировец. – Харьков: Апостроф, 2011 – 104 с.
14. Красочко, П. А. Иммунология / П. А. Красочко, Ю.Н.Федоров, В.С. Прудников. – Мн.: Аверсэв, 2005 – 128 с.
15. Лебедев, К. А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. — М.: Медицинская книга, 2003. — 443 с.
16. Магдалска, З. Попытка лечения расстройств системы свертывания крови и аплазии при помощи маточного молочка / З. Магдалска. //XXXI Международный конгресс по пчеловодству. Бухарест: Апимондия, 1987. – 497 с.
17. Макарова, В. Г. Действие маточного молочка на органы пищеварительного тракта / В. Г. Макарова, Д. Г. Узбекова // Продукты пчеловодства: биологические и фармакологические свойства, клиническое применение – Рязань, 2000. – 273 с.
18. Макарова, В. Г. Действие маточного молочка на органы пищеварительного тракта / В. Г. Макарова, Д. Г. Узбекова // Продукты пчеловодства: биологические и фармакологические свойства, клиническое применение – Рязань, 2000. – 364 с.
19. Макарова, В.Г. Изучение кардиопротекторного действия продуктов пчеловодства./В. Г. Макарова, А. Н. Рябков, Д. Г. Узбекова. //Апитерапия сегодня: Тез. докл. III науч.-практ. конф. Рыбное. –1994. – С. 7-9.

20. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Коллектив авторов под председательством А. Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944с.
21. Младенов, С. Мед и медолечение/С. Младенов. — К.: София, 1969.— 222с.
22. Новикова, И. А. Вторичные иммунодефициты: клинико- лабораторная диагностика (лекция) / И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. — 2009. — №1 (19). — С. 29-34.
23. Орлов, Б.Н. Проблемы апитерапии / Б. Н. Орлов //Пчеловодство. 1993. — №4. — С. 19-20
24. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. — М.: Наука, 1985. — 536 с.
25. Прохода, И.А. Биологическая активность трутневого гомогената / И. А. Прохода. — Пчеловодство — 1996. — №2. — 59 с.
26. Резяпкин, В. И. Лабораторный практикум по биохимии и биофизике / В. И. Резяпкин, В. С. Слышенков, И. Б. Заводник, В. Н. Бурдь. — Гродно: ГрГУ, 2009. — 175 с.
27. Роберт, С. Методы очистки белков / С. Роберт, пер. с англ. проф. В.К. Антонова. — М.: Мир — 1985 г. — 358 с.
28. Руанет, В.В. Теория и техника лабораторных работ / В. В. Руанет. — М.: ВУНМЦ Росздрава, 2007. — 176 с.
29. Рут, А.И. Энциклопедия пчеловодства./ А. И. Рут, Э. Р. Рут, Х. Х. Рут, Е. И. Северцова. — М.: Художественная литература, 1993 — 368 с.
30. Северин, Е.С. Биохимия / Е. С. Северин. — М.:ГЭОТАР-МЕД, 2003—779 с.
31. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. — М.: Мир, 1985. — 358с.
32. Скурихина, И. М. Химический состав пищевых продуктов / И.М. Скурихина, М. Н. Волгарева. — М.: Агропромиздат, 1987 — 360 с.
33. Стефани, Д.В. Клиническая иммунология и иммунопатология детского возраста / Д. В. Стефани, Ю. Е. Вельтищев. — М.: Медицина, 1996. — 384 с.

34. Фритц, Дж. Ионная хроматография: Пер с англ./ Дж. Фритц, Д. Гьерде, К.Поланд. – М.: Мир, 1984. – 224с.
35. Хабленко, А.А. Трутневое молочко в качестве стимулятора / А. А. Хабленко // Пчеловодство. – 1985. – №6 – с. 26.
36. Хаитов, Р. М. Иммунология / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, Г. И. Сидорович. — М.: Медицина, 2000. — 432 с.
37. Хаитов, Р. М. Экологическая иммунология / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Х. И. Истамов. – М.: ВНИРО, 1995. – 219 с
38. Хисматуллина, Н. З. Апитерапия / Н. З. Хисматулина. – Пермь: Мобиле, 2005. – 296 с.
39. Цибульский, А. П. Иммунная система человека – от защиты к патологии / А.П. Цибульский, И. М. Хисматуллина // Казанский медицинский журнал. – 2006. – Т. 81, вып. 1. – с. 1 – 7.
40. Шарков, В. И. Химия гемицеллюлоз / В. И. Шарков, М. И. Куйбина. – М.: Лесная промышленность, 1972. – 440 с.
41. Шеметков, М. Ф. Продукты пчеловодства и здоровье человека / М. Ф. Шеметков, Д.К. Шапиро, И.К. Данусевич. – Мн.: Ураджай, 1987. – 100 с.
42. Шеметков, М. Ф. Советы пчеловоду / М. Ф. Шеметков, В. И. Головнев, М. М. Кочевой. – Минск: Ураджай, 1991. – 398 с.
43. Bonvehí, S.J. Studies on the protein and free amino acids of royal jelly // *Anales de Bromatologia*. – 1990. – V. 42, №2. – P. 353-365.
44. Cantani, A. Pediatric Allergy, Asthma and Immunology / Arnaldo Cantani. – Berling: Springer. – 2008. – 1619 p.
45. Carson, R. Simultaneous quantitation of fifteen cytokines using a multiplexed flow cytometric assay / R. Carson, D. Vignali // *J. Immunol. Mech.* – 1999. – V. 227. – P. 41 - 52.
46. Das, C. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells / C. Das, V. Kumar, S. Gupta [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2001. – V. 53. – P. 257 – 268.

47. Lee, C. Y. Molecular cloning of the porcine acid-labile subunit (ALS) of the insulin-like growth factor -binding protein complex and detection of ALS gene expression in hepatic and non-hepatic tissues / C. Y. Lee, I. Kwak, C. S. Chung [et al.] // J. Mol. Endocrinol. – 2001. – V. 26. – № 2. – P. 135 – 144.
48. Liles, W. C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response / W. C. Liles, W. C. Van Voorhis W.C. // J. Infect. Dis. – 1995. – V. 172. – № 6. – P. 1573 – 1580.
49. Lowry, O.H., Rosebrought N.J., Farr A.G., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265-275.
50. Masihi, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections / K. N. Masihi // Antimicrobial Agent. – 2000 Apr. – Vol. 14. – N 3. – P. 181 – 191.
51. Romanelli, A., Moggio L, Montella RC, Campiglia P, Iannaccone M, Capuano F, Pedone C, Capparelli R., – Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins // Journal of peptide science. – 2011 – 17(5) – P. 52-101.
52. Schmitzova, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* / J. Schmitzova, J. Klaudiny, S. Albert, W. Schröder, W. Schreckengost, J. Hanes // Cell Mol. Life. Sci. – 1998. – V. 54. – P. 1020–1030.
53. Spickett, G. Oxford handbook of clinical immunology and allergy / Gavin Spickett. – Oxford : University Press, – 2006. – 627 p.
54. Werner, G. H. Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications / G. H. Werner, P. Jolles // Eur J Immunol. – 1996. – V. 242. – P. 1–19.
55. 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 – P. 310-314.
56. Yatsunami, K., Echigo T. Antibacterial action of honey and royal jelly // Honeybee Science, 1985. – V. 5, №3. – P. 125-130.

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 Антоновой Марины Николаевны

Тема работы «Разработка оценки биологической активности
иммуностимулирующего фактора из продуктов пчеловодства».

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

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

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Изучение научной литературы по тематике ВКР, написание введения, глав обзора литературы («Иммунодефицитные состояния», «Иммуностимулирующие препараты», «Апитерапия», «Биохимический состав продуктов пчеловодства»).	ноябрь 2016 – февраль 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 методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение».	февраль – май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания « 2 » 11 2016г.

Руководитель _____

(подпись)

Задание принял к исполнению _____

(подпись)