

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:

**«ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ ПЕРГИ»**

Студент  Седякин Вячеслав Алексеевич

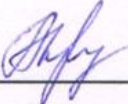
Руководитель  Соловьев В.Б.

Нормоконтролер  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 19.06.17 № 5)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Перга, ее состав и свойства	6
1.1.1 Происхождение перги и ее значение.....	6
1.1.2 Химический состав перги.....	8
1.1.3 Биологически активные вещества, входящие в состав перги.....	11
1.2 Биологически активные пептиды и их свойства.....	16
1.2.1 Биологически активные пептиды и их роль.....	16
1.2.2 Физико-химические свойства пептидов.....	18
1.3 Пептиды перги.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1 Материалы и объект исследования.....	22
2.2 Методы исследования.....	22
2.2.1 Подготовка исследуемого образца.....	22
2.2.2 Метод Лоури.....	24
2.2.3 Проба Селиванова.....	25
2.2.4 Ультрафильтрация.....	26
2.2.5 Ионообменная хроматография.....	27
2.2.6 Тест «Открытое поле».....	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Определение содержания белка и углеводов.....	33
3.2 Хроматографическое разделение.....	35
3.3 Катионообменная хроматография.....	36
3.3.1 Подбор оптимальной дозы наносимого на колонку раствора перги.....	36
3.3.2 Ход разделения.....	40
3.4 Анионообменная хроматография.....	41

3.5 Оценка метода ионообменной хроматографии.....	42
3.6 Исследование биологической активности пептидов перги.....	42
3.6.1 Оценка двигательной активности тестом «открытое поле».....	43
3.6.2 Тест Порсолта на депрессивность.....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время в России ведется активная пропаганда здорового образа жизни, и особое внимание уделяется правильному питанию. При этом мёд и другие продукты пчеловодства рекомендуются в качестве неотъемлемого компонента рациона. Мёд, прополис, перга, пыльца, маточное молочко – уникальные продукты, содержащие в своем составе целый комплекс полезных компонентов: углеводов, белков, микроэлементов, витаминов и других биологически активных веществ [42].

Продукты пчеловодства быстро усваиваются, хорошо переносятся, в большинстве случаев не имеют побочного действия и противопоказаний к применению, за что с каждым годом приобретают все большую популярность. Кроме того, широкий спектр биологических эффектов продуктов пчеловодства позволил им найти применение в фармакологии и медицине [23]. Создание на их основе биологически активных добавок и лекарственных препаратов остается актуальным направлением современных исследований.

Перга является одним из ключевых продуктов пчеловодства, содержащим в своем составе усваиваемые углеводы, белки, пептиды, незаменимые аминокислоты, незаменимые жирные кислоты, флавоноиды, минеральные вещества, витамины и другие полезные соединения. Перга является ценным пищевым продуктом и находит широкое применение в качестве биологически активной добавки. Сложный многокомпонентный состав перги обуславливает все многообразие биологических эффектов пчелопродукта. Известно, что перга обладает антиоксидантным, противоопухолевым действием, оказывает благотворный эффект на кроветворение. Под действием перги в крови происходит увеличение гемоглобина, эритроцитов и ретикулоцитов. Помимо всего

вышеперечисленного перга благоприятно влияет на метаболические процессы, происходящие в организме. Перга, как и пчелиная обножка, имеет следующие биологические эффекты: анаболический, кардиотонический, радиопротекторный, антитоксический, иммуностимулирующий и другие[29].

Выделение отдельных компонентов перги, ответственных за проявление определенного эффекта, позволило бы повысить эффективность терапии.

На роль таких компонентов отлично подходят пептиды. Наличие пептидов в продуктах пчеловодства в целом, и в перге конкретно было доказано уже давно, однако механизмы действия отдельных групп пептидов до конца не изучены[43]. Также следует отметить, что все большую популярность набирают пептидные препараты, выделенные из природных источников, так как они оказывают целевое воздействие при отсутствии каких-либо побочных эффектов, и препараты на основе продуктов пчеловодства не являются исключениями [25, 28].

Выделение из перги групп пептидов, обладающих определенной активностью и свойствами, будет способствовать получению пептидных препаратов на основе пчелопродуктов, а также передаче основных биологических эффектов продуктов пчеловодства фармакологическим препаратам в легко усваиваемой форме, что благотворно скажется на развитии, как медицины, так и других областей деятельности человека[28, 30].

Целью работы является выделение, очистка и изучение биологических свойств пептидов перги.

Для достижения цели поставлены **следующие задачи:**

1. Провести анализ литературы по теме исследования.
2. Провести выделение и очистку пептидных фракций перги.
3. Исследовать биологическую активность выделенных пептидов.

Бакалаврская работа написана на 51 листе, содержит 7 рисунков, 8 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 53

ИСТОЧНИКОВ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Перга, ее состав и свойства

1.1.1 Происхождение перги и ее значение

Перга – пыльца-обножка, собранная пчелами, обработанная слюной и сложенная в соты. Она утрамбована и запечатана сверху мёдом и восковой крышечкой. Пергу называют пчелиным хлебом, поэтому можно утверждать, что ее роль в функционировании пчелиной семьи достаточно велика. Она представляет собой корм, содержащий в составе белки, жиры, углеводы и минеральные вещества, и совмещает в себе свойства и пыльцы, мёда[32].

Пыльца пристает к волоскам на теле пчелы с открытых пыльников растений или при прогрызании нераскрывшихся пыльников. Позже она складывается в чашечки на ногах насекомого. Для того чтобы пыльца не падала, уже на этом этапе она смачивается нектаром. Собранную с растений пыльцу-обножку пчела приносит в улей и укладывает в ячейку, в которой до этого выводились молодые пчелы. В отличие от стандартной ячейки, такая ячейка имеет более округлую форму, так как оставшийся от выводка кокон немного сглаживает внутренние углы. После, молодые пчелы утрамбовывают пыльцу на дно ячейки[45]. Пчела упирается ногами в стенки ячейки и трамбуется собранную в комочки пыльцу, предварительно смачивая слюной, содержащей ферменты, и нектаром, собранным с того же растения. Трамбовка осуществляется постепенно, по мере заполнения ячейки. Когда ячейка заполняется на $3/4$ своей величины, пчелы заливают ее мёдом, а после запечатывают восковой крышечкой, содержащей прополис[48].

Причем, при заполнении ячейки, пыльца не всегда бывает собрана с одного растения. Лишь в определенных случаях бывает так, что пыльца собрана с одного растения. В большинстве же случаев в одной ячейке

находится 4-5 слоев пыльцы-обножки, собранной с разных растений. В одной ячейке сота может содержаться до 18 обножек. Общий вес этой ячейки составляет 150-180 мг. Этого вполне достаточно для выживания одной пчелы[33, 11, 12].

Перга занимает примерно 75% ячейки. Это связано с необходимостью размазывания и уплотнения пыльцы. Благодаря неполному заполнению ячейки пчела имеет надежную опору для дальнейшей трамбовки. Если же ячейка заполнится до края, то опоры не будет и пчела не сможет уплотнять пыльцу.

Позже в пыльце, обработанной слюной и нектаром, а позднее залитой мёдом и запечатанной воском, начинают размножаться молочнокислые бактерии, обеспечивающие соответствующее брожение. Они постепенно выделяют молочную кислоту, а, как известно, она является отличным консервантом[33]. Однако для корректной консервации необходимо соблюдение нескольких условий. Во-первых, пыльца должна быть хорошо утрамбована. Во-вторых, недопустимо попадание воздуха внутрь запечатанной ячейки. При соблюдении этих условий перга может храниться длительное время [12].

В результате молочнокислого брожения происходит превращение пыльцы в пергу, обусловленное рядом химических изменений. В итоге перга начинает превосходить по некоторым своим качествам пыльцу. Количество углеводов, витаминов и ферментов в перге значительно выше, чем в предшествующей ей пыльце. Но по содержанию белков и жиров перга немного уступает пыльце. Суммарная же полезность выше у перги. Перга обладает большей энергетической ценностью, а также лучшей усваиваемостью в организме. Следовательно, использование перги в качестве подкормки или пищевой добавки целесообразнее, чем использование пыльцы[19].

И хотя преобладающим элементом в перге являются углеводы, пчелами она используется как белковый и жировой корм. Главными потребителями

перги в пчелиной семье считаются пчелы кормилицы. Они поедают пергу, а за счет содержащихся в ней белковых и жировых соединений, витаминов и минеральных веществ они вырабатывают глоточными железами молочко, которым кормят личинок и матку. Более взрослые личинки, возрастом от 2 до 5 дней употребляют в пищу смесь перги и мёда, доставляемую пчелами кормилицами[38]. Особенно перга необходима весной и в начале лета, в период роста семьи. Если в этот промежуток времени перги нет или ее количество снижается, развитие пчелиной семьи существенно замедляется и может даже остановиться. Перга необходима также в период зимования. Ее используют уже не молодые, а взрослые пчелы в качестве резервного источника поддержания белка и жира, которых недостаточно в мёде. Таким образом, перга имеет очень важное значение для пчелиной семьи благодаря своему составу и свойствам[3, 12, 22].

1.1.3 Химический состав перги

Химический состав пчелиной обножки и перги во многом схож, но при этом и отличается. Благодаря добавлению к перге на время консервации мёда, содержание углеводов возрастает в 2,5 раза. В основном они представлены глюкозой и фруктозой. Количество некоторых других веществ в составе перги уменьшается. Содержание жиров в ней снижается до 1,5%. Минеральные вещества и белки в перге так же имеются в малом количестве, хотя перга и считается основным белковым кормом пчелиной семьи. Содержание витаминов в перге значительно выше, чем в пыльце. Исключением является витамин С. Его содержание в перге немного меньше, чем в пчелиной обножке[50]. В свою очередь, соединения, чье содержание в перге уменьшается, переходят в более усваиваемые формы. Благодаря этому она не оказывает токсического влияния на организм. Содержание минеральных веществ, как в перге, так и в предшествующей ей обножке может колебаться. Обычно оно составляет 1-7%. Установлено содержание

следующих химических элементов: натрий 7-12%, калий 8-9%, магний 1-11%, фосфор 1-19%, кальций 1-15%, железо 0,1-8%, хлор 0,8-1%, сера-до1%. В меньших количествах обнаружены и другие химические элементы, однако их содержание не превышает 1%[5, 29].

Сравнительная характеристика пыльцы и перги показывает изменение состава перги за время консервации (таблица 1). Основные сборы перги осуществляются в период активного роста семьи. Принято считать, что такими периодами являются весна и лето. Поэтому пергу можно условно разделить на две группы: весеннюю и летнюю. Химический состав этих групп во многом схож. Однако отличия также имеются (таблица 2). Достоверно установлено, что перга весеннего и летне-осеннего периода сбора отличаются по содержанию витаминов группы В и С, никотиновой кислоты и каротиноидов. В весенней перге больше глюкозы на 10%, никотиновой кислоты на 40%. Помимо этого был определен аминокислотный и жирокислотный состав обоих видов перги, однако существенных отличий он не показал. Различия заключались в количестве аспарагиновой и глутаминовой кислоты от общего количества белка[4, 23, 28].

Таблица 1.

Химический состав пчелиной пыльцы и перги

	Состав пыльцы (%)	Состав перги (%)
Углеводы	19	37
Жиры	3,5	0,0-1,5
Белки	21-40	15-22
Минеральные вещества	2,55	2,43
Молочная кислота	0,5	3-3,5
Вода	5-35	5-18
Витамины	(мг,%):	(мг,%):

	A – 0.6-212.0	A – 50
	C – 7.0-205	C – 140-205
	E – 0.3-17.0	E – 170
	D – 0.2-0.6	D – 0.2-0.6
	P – 1.7-2.4	P – 60
	H – 0-0.65	
	B1 – 0.5-1.5	
	B2 – 0.5-2.5	B2 – 0.4-0.5
	B3 – 4.8-21.0	
	B5 – 0.32-5.0	
	B6 – 0.5-0.9	B6 – 0.54-1.9
	B12 – 0.1	B12 – 0.5-0.9

Таблица 2.

Химический состав перги разного ботанического происхождения.

Показатель	Весенняя	Осенне-летняя
Общее количество белка, %	25±2,0	26±3,0
Глюкоза, мг/г	98,4±0,9	89,1±0,9
Витамин В1, мкг/г	1,79±0,8	3,15±0,8
Витамин В2, мкг/г	32,9±0,4	33,72±0,7
Никотиновая кислота, мг,%	55,4±0,8	34,8±0,5
Витамин С, мг,%	49,3±0,2	32,4±0,3
Каротиноиды мкг/г	99,4±0,5	85,2±0,6

Дальнейший ботанический анализ перги показал различия в активности некоторых ферментов. Активность таких ферментов, как амилаза, дезоксирибонуклеаза и рибонуклеаза в перге сбора летне-осеннего периода значительно превышает активность таковых в весенней перге. В случае первого фермента активность выше в 10 раз, в 50 и в 40 в случае второго и

третьего фермента соответственно.

Проведенное исследование позволило сделать несколько выводов и пчелиной перге. Во-первых, её можно охарактеризовать как продукт пчеловодства, на состав которого влияют пыльценосы, произрастающие в области нахождения пчелиной семьи. Во-вторых, на пергу оказывают влияние потребности пчёл, что позволяет варьировать и изменять количество соединений входящих в состав перги.

Разделение перги на группы весеннего и летне-осеннего сбора позволяет более точно охарактеризовать химический состав перги и выяснить причины его непосредственного отличия. Дальнейшее исследование помогут выявить физико-химическую и биологическую активность перги, и подтвердить высочайшую ценность этого продукта[4, 26].

1.1.2 Биологически активные вещества, входящие в состав перги

Состав пчелиной обножки, а, следовательно, и перги очень разнообразен. Это обусловлено тем, что в состав перги входит большое количество соединений, полученных из собранной пыльцы. Так как каждому виду растений свойственен свой собственный состав пыльцы-обножки, хоть и схожий с другими, в пергу попадают соединения из всех видов пыльцевых зерен, занесенных в одну ячейку. Поскольку количество различных видов пыльцы в одной ячейке сота составляет от пяти до десяти единиц, то и состав перги, полученной из этой ячейки, представляет собой целый комплекс белков, углеводов, жиров, свободных аминокислот, минеральных веществ, макро- и микроэлементов в совокупности с различными фитогормонами, пигментами и ароматическими веществами[10].

Протеины представлены в перге в виде нескольких основных групп. К ним относят альбумины, глобулины и пептоны. Они составляют 20-25% общей массы. По своему аминокислотному составу перга схожа с другими

продуктами, богатыми белком. Причем, перга даже превосходит некоторые продукты по их количеству[41]. Она содержит в своем составе все незаменимые для человека аминокислоты. Причем данные аминокислоты представлены в концентрированном виде.

Помимо аминокислот, входящих в состав соединений белковой природы, в перге присутствуют и свободные аминокислоты. Их доля не велика, и не превышает 1% сухого веса. Преобладающими среди них являются аспарагиновая и глутаминовая кислоты, а также пролин. Остальные аминокислоты в перге тоже присутствуют, однако их содержание незначительно.

Углеводные компоненты в перге составляют от 20 до 40%. Они представлены глюкозой, фруктозой, сахарозой, галактозой, раффинозой, декстринами, крахмалом и целлюлозой. Преобладающими компонентами являются глюкоза и фруктоза. Они попадают в пыльцу с мёдом и нектаром, и переходят в пергу. Доля других компонентов относительно не велика. Содержание крахмала и клетчатки обычно не выше 2%.

Липидные компоненты в перге представлены различными жирными кислотами, спиртами, кетонами, углеводородами. Их количество может варьироваться, но в среднем составляет 1-5%. Так же там присутствуют другие соединения липидной природы. В состав входят до десяти жирных кислот. Важнейшими из них являются полиненасыщенные жирные кислоты, которые можно отнести к жизненно необходимым веществам. Это арахидоновая, линолевая и линоленовая кислоты. Они получили название витамин F. В организме полиненасыщенные жирные кислоты выполняют самые различные функции. Они могут быть как предшественниками гормоноподобных веществ, так и понижают уровень холестерина и снижают артериальное давление[3, 28].

В перге содержится сильный витаминный комплекс, который может включать в себя до одиннадцати компонентов. Каждый из этих витаминов оказывает влияние на организм[7].

Аскорбиновая кислота (витамин С) играет наиважнейшую роль в организме. Она способствует усвоению кальция и железа. Участвует в образовании структурных компонентов соединительной ткани костей, хрящей и зубов. В комплексе с белками формирует внутриклеточное вещество, которое участвует в заживлении ран, то есть производит регенеративный эффект. Помимо всего вышеперечисленного осуществляет протекторное действие на другие витамины, такие как никотиновая и пантотеновая кислоты.

Рибофлавин (витамин В2) принимает участие в процессах синтеза АТФ (процессах окисления и энергообразования). Также он входит в состав родопсина, пигмента глаза, защищающего сетчатку от сильного ультрафиолетового воздействия. Недостаток рибофлавина может привести к некоторым отклонениям, к ним относят шелушение кожи, светобоязнь и слезотечение.

Тиамин (витамин В1) необходим при осуществлении процессов биосинтеза. Причем и в синтезе белков, и в синтезе нуклеиновых кислот, и даже жиров. Также оказывает существенное влияние на процессы метаболизма. В основном это метаболизм углеводов и некоторых разветвленных аминокислот. Влияет на деятельность желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой и эндокринной систем.

Токоферол (витамин Е) находится в организме в роли антиоксиданта. Он препятствует развитию перекисного окисления липидов мембран, гормонов и также повышает устойчивость эритроцитов. Присутствие в нормальном объеме токоферола позволяет стандартизировать и лучше усваивать белок, жиры и другие витамины. При увеличении количества полиненасыщенных жирных кислот в принимаемой пище может проявиться недостаточность токоферола.

Биотин (витамин Н) играет ключевую роль в организме. Он входит в состав активных центров различных соединений. К таким соединениям относят ферменты метаболизма углеводов, аминокислот и некоторых

жирных кислот. В основном биотин поступает в организм с пищей, однако часть синтезируется кишечной микрофлорой. Его недостаток в организме может вызывать некоторые заболевания, такие как депрессия, астения и некоторые виды дерматита.

Никотиновая кислота (витамин В3 или РР). Также в некоторых источниках никотиновая кислота упоминается как ниацин. Как и другие витамины, она имеет колоссальное значение в организме. В основном она участвует в процессах биологического окисления. Однако это участие осуществляется только на ранних стадиях. Другой не маловажной функцией никотиновой кислоты является ее регулирующее действие. В основном оно приходится на высшую нервную деятельность, хотя и захватывает все функции центральной нервной системы. Никотиновая кислота может синтезироваться и в организме человека. Однако при неправильном питании возникает ее недостаток, что негативно сказывается на состоянии организма в целом.

Пантотеновая кислота (витамин В5) также как и другие участвуют в процессе окисления. Это ферментативное окисление. Однако она принимает участие и в биологическом синтезе. Объектом действия пантотеновой кислоты являются в основном соединения липидной природы. Это жирные кислоты, холестерин и гормоны, триглицериды и фосфолипиды, а также ацетилхолин. Существует большое количество факторов, снижающих содержание пантотеновой кислоты. К ним относят кишечные инфекции и использование антибиотиков. Это связано с тем, что часть действующей пантотеновой кислоты синтезируется кишечной микрофлорой. Помимо нарушения работы кишечника, недостаток пантотеновой кислоты может наблюдаться из-за снижения содержания в организме фолиевой кислоты и витамина С.

Фолиевая кислота (витамин В9) принимает участие в синтезе нуклеиновых кислот. Также фолиевая кислота оказывает влияние на обмен аминокислот. Основное действие приходится на ткани и органы, в которых

большая скорость пролиферации, то есть деления клеток. Это в основном кроветворная и слизистая кишечника. Фолиевая кислота в больших количествах содержится в продуктах животного происхождения. Следовательно, бедность рациона и неправильная термическая обработка могут привести к недостатку данной кислоты в организме.

Каротиноиды содержатся в пыльце в большом количестве. Это а- и в-каротин, ксантофилл, ликопен. Наличие каротиноидов в пыльцевых зернах обуславливает их окраску, а, следовательно, дальнейшую окраску и перги. Еще среди каротиноидов обнаружен зеаксантин, предшественник витамина А, или ретинола. Он принимает участие в развитии и формировании костной и эпителиальной ткани. При дефиците как витамина А, так и других каротиноидов наблюдается ухудшение состояния волос и кожи, шелушение, сухость во рту и носоглотке и заболевания желудочно-кишечного тракта. Основными источником ретинола являются животные продукты. Дефицит белков, жиров и некоторых других витаминов ухудшает усвоение витамина А.

Флавоноиды, или фенольные соединения, содержатся в перге в большом количестве. У них есть несколько физиологических эффектов в зависимости от класса соединения. Флавоноиды обладают антиоксидантным, бактерицидным, мочегонным, радиопротекторным, спазмолитическим и другими действиями. Часть из них обладает биологической активностью, другая укрепляет стенки сосудов, некоторые способны предотвращать анафилактический шок[7, 17].

Содержание витаминов в пчелиной обножке достаточно высоко (таблица 3). При образовании перги из пчелиной обножки количество витаминов изменяется. Они представлены куда шире. Это обусловлено действием дрожжей, которые содержатся в перге. Они синтезируют целый комплекс, состоящий из витаминов, липидов и ферментов[52].

Одним из важных свойств перги является ее почти полная усваиваемость. Однако при использовании ее в пищу, следует правильно

подбирать дозировку, и помнить, что перга является природной биологически активной добавкой[23].

Таблица 3.

Содержание витаминов в 100г пчелиной обножки, мг

Ретинол (А)	0,6-212
Каротин (провитамин А)	14
Тиамин (В1)	0,4-1,5
Рибофлавин (В2)	0,54-1,9
Никотиновая кислота (В3 или РР)	4,8-21
Пантотеновая кислота (В5)	0,32-5
Пиридоксин (В6)	0,5-0,9
Фолиевая кислота (В9)	0,1-0,68
Аскорбиновая кислота (С)	7-205
Токоферол (Е)	0,3-170
Биотин (Н)	0-0,25
Рутин, флавоноиды (Р)	1,7-2,4

1.2 Биологически активные пептиды и их свойства

1.2.1 Биологически активные пептиды и их роль

Пептиды – группа веществ, состоящих из нескольких аминокислотных остатков, соединенных между собой пептидными связями. Такой вид связи еще называют амидной. Она образуется между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой кислоты. Пептиды включают в себя от 2 до 50 остатков аминокислот. Молекула, включающая в себя более 50 аминокислот, уже будет считаться белком. Известно, что белки являются, в своем роде, универсальными соединениями[47]. К ним относят ферменты,

строительные, иммунологические и энергетические белки. Пептиды же являются не столь универсальными соединениями. Можно утверждать, что они выполняют всего одну функцию. Это регуляторная функция. Обладая физиологической активностью, пептиды участвуют в регуляции важнейших процессов в организме[36]. Было принято разделить их на несколько групп в зависимости от их действия на организм (таблица 4). Однако, в дальнейшем, было принято считать это деление условным, так как действие какого-либо пептида не всегда направлено на регуляцию конкретного процесса, а также может затрагивать и другие реакции организма. Поэтому перспективным направлением науки было выделение пептидов с избирательным действием.

Таблица 4.

Условные группы биологически активных пептидов

Область действия	Представитель
Гормональная активность	Окситоцин, вазопрессин, глюкагон
Эмоциональное состояние	Эндорфины
Тонус сосудов и артериальное давление	Брадикинин, ангиотензинII
Иммунологическое действие	Тафцин
Противовоспалительное и противоопухолевое действие	Луназин
Пищеварительная регуляция	Гастрин
Регуляция аппетита	Лептин
Обезболивающее действие	Опиоидные пептиды

Исследование пептидов началось еще с 50-х годов. Одним из важнейших достижений этого промежутка времени было открытие и дальнейшее производство пептидного гормона, относящегося к классу биологически активных веществ, окситоцина. Естественно, после данного

открытия начинается использование биологически активных пептидов, выделенных из какого либо природного компонента или синтезированного искусственно[37]. Их начинают производить промышленно и использовать повсеместно. Сейчас насчитывается несколько десятков пептидных соединений, используемых в медицине, химии и биологии. Однако на фоне всех имеющихся у нас биологически активных соединений, лекарственных препаратов, пищевых добавок и природных компонентов, эти пептиды и их производные выглядят довольно скромно. Поэтому данная сфера исследований имеет важные предпосылки к развитию и дальнейшему рассмотрению с целью создания кардинально новых групп и классов соединений, обладающих высокой биологической активностью[18, 25].

1.2.2 Физико-химические свойства пептидов

После открытия пептидов, расшифровки их структуры и дальнейших исследований удалось выделить основные физико-химические свойства пептидов. Установлено, что основные свойства пептидов определяются их химическим, то есть аминокислотным составом[44]. В зависимости от входящих в состав аминокислот пептиды могут не иметь или иметь заряд (положительный, отрицательный). Они могут проявлять основные, кислотные или амфотерные свойства. Как и другие соединения, они имеют изоэлектрическую точку, следовательно, могут быть разделены на составляющие каким либо методом.

В общих чертах пептиды можно охарактеризовать по нескольким признакам. По числу аминокислотных остатков выделяют олигопептиды и полипептиды. Олигопептиды включают в себя до 10 аминокислотных остатков. К ним могут относиться дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и т.д. Полипептиды включают в себя уже свыше 10 аминокислотных остатков. По составу пептиды так же можно разделить на 2 группы: гомомерные и гетеромерные. К первой группе относят соединения, которые при распаде

образуют только аминокислоты. Во второй группе пептидов при гидролизе, помимо аминокислот, образуется какой либо неаминокислотный компонент. От данного компонента и будет зависеть строение, функции и название пептида. К этой группе можно отнести фосфопептиды, гликопептиды, липопептиды и другие[49]. Дальнейшее деление осуществляется по виду образованной связи. Здесь выделяют гомодетные и гетеродетные пептиды. В гомодетных связи представлены только пептидными. В гетеродетных могут присутствовать и другие виды связей (сложноэфирные, дисульфидные и др.). Это также оказывает влияние на функции пептидов[8,13, 30].

Как уже упоминалось выше, физико-химические свойства пептидов обусловлены аминокислотами, входящими в их состав. Пептиды представлены кристаллическими веществами. Они обладают довольно высокой температурой плавления, которая составляет 200-300 °С. Данные кристаллические вещества мало отличаются от привычных аминокислот. Пептиды довольно хорошо растворяются в воде. Также неплохо растворяются в разбавленных кислотах и щелочах, однако вообще не растворяются в каких либо органических растворителях[46]. Имея в своем составе и кислотную, и основную группы, пептиды являются амфотерными соединениями. Они могут существовать в различных формах, будь то катион, анион или цвиттер-ион. Таким образом, химические свойства пептидов такие же, как и у составляющих их аминокислот.

Первым свойством является их необычное строение. Кислотная и основная группа одного пептида могут взаимодействовать и образовывать так называемые внутренние соли (цвиттер-ионы). Вторым, не менее важным, свойством является амфотерность. Это свойство позволяет входящим в состав аминокислотам образовывать соли как с кислотами, так и со щелочами. Некоторые аминокислоты поддаются ацитилированию. В результате данной реакции образуются ацильные производные аминокислот. Так же при взаимодействии со спиртами, из аминокислот входящих в состав

пептида, могут образоваться сложные эфиры. Можно подвести итог, что по своим химическим свойствам олигопептиды (молекулы, имеющие в своем составе до десяти аминокислот) по своим физико-химическим свойствам близки к отдельным аминокислотам. Группа полипептидов (молекул, включающих более 10 аминокислотных остатков) похожа по свойствам на белки[15].

1.3 Пептиды перги

Выделение из природных компонентов соединений с определенными свойствами дает возможность разработки огромного количества новых биологически активных добавок и лекарственных препаратов, превосходящих по своим свойствам имеющиеся аналоги[35]. Перга, как объект исследования не стала исключением. Отправной точкой исследования перги была ее биологическая активность. Личинки пчел, питающиеся в начале своего развития пергой, набирают значительную биомассу. В некоторых источниках утверждается, что биомасса личинок рабочих пчел может увеличиваться в 1500 раз в течение нескольких дней. Если сравнить пыльцу и пергу по пищевой ценности, то можно увидеть существенное превосходство перги. Она превосходит обножку в 3 раза. А если сравнить с заменителями пыльцы, то перга превосходит их даже в 9 раз. Вероятным источником такой биологического действия и дальнейшей целью для исследования были пептиды, содержащиеся в перге[1, 21, 53].

Отличием природных пептидов, от пептидов, появившихся в результате процессинга белков, является наличие небелковых аминокислот (алкилированные аминокислоты, D-аминокислоты и др). Позже было установлено, что выделение и дальнейшее исследование биологически активных групп пептидов перги, и создание на их основе фармакологических препаратов и пищевых добавок поможет произвести прорыв почти во всех областях жизни человека [34]. Издавна внимание биологов, химиков и

медиков привлекают пептиды как класс биологически активных соединений. Ранее на роль таких соединений претендовали белки, однако возникли вопросы со способом их введения в организм реципиента, поскольку в ходе переваривания их в желудочно-кишечном тракте теряется биологическая активность. Пептиды по сравнению с белками имеют меньшую молекулярную массу, могут вводиться парентерально, что существенно расширяет возможные области их применения в медицине. Кроме того данное преимущество способствует более удобному и менее трудоемкому исследованию данной группы веществ и определению их физико-химических свойств [6, 8, 20].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Материалом для исследования являлись пептидные фракции, выделенные из раствора перги. Перга до начала эксперимента была очищена от сот и хранилась в замороженном виде в плотно закрытой таре.

Выделение и очистка пептидных фракций осуществлялась из 20% рабочего раствора перги. Рабочий раствор представлял собой растворенную в воде пергу, очищенную от балластных примесей и высокомолекулярных соединений при помощи методов механической фильтрации, центрифугирования и ультрафильтрации. Готовый фильтрат хранился в закрытой стеклянной таре в морозильной камере при -40°C . Данный раствор использовался для проведения дальнейших испытаний.

Экспериментальное исследование проводилось на белых беспородных крысах в возрасте трех месяцев массой 200 – 250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Подготовка исследуемого образца

Исходным материалом является пчелиная перга. Особое внимание следует уделить ее состоянию и условиям хранения. Перга должна быть собрана не более года назад, при этом она должна храниться в замороженном виде. Недопустимо образование плесени и возникновение процессов брожения в сотах. Ячейки, в которых имеются какие либо видимые загрязнители, забраковываются и не используются в эксперименте. Для приготовления рабочего раствора, который будет использоваться для

дальнейших исследований необходимо взять 100 г очищенной от сот пчелиной перги. Перга переносится в фарфоровую ступку и гомогенизируется (перетирается) с небольшим количеством воды. Гомогенизация – процесс, в ходе которого уменьшается степень неоднородности веществ, и происходит распределение этих веществ по всей системе. Полученный гомогенат переносят в мерную колбу и доводят водой до отметки 500 мл с целью полноценного растворения в воде. Таким образом, получается 20% раствор пчелиной перги.

Дальнейшим этапом было использование метода замораживания-оттаивания. Это традиционный метод, который используют для разрушения клеток. Под действием низких температур происходит кристаллизация воды, находящейся внутри клетки. Образующиеся кристаллы льда увеличиваются в размере и разрывают клеточную оболочку, высвобождая содержимое клетки. В нашем случае этот метод использовался для разрушения оболочек пыльцевых зерен обножки, которая есть в перге. Рабочий раствор перги был трижды заморожен и разморожен с целью полного высвобождения содержимого пыльцевых зерен.

Очистка, как следующий этап, начинается с центрифугирования полученного ранее раствора. Центрифугирование – разделение неоднородных компонентов гетерогенной системы под действием центробежных сил. Центрифугирование, с целью освобождения от высокомолекулярных соединений, осуществлялось на рефрижераторной центрифуге при температуре 4°С в течение 30 минут при 8000 об/мин. Надосадочная жидкость собиралась и снова подвергалась центрифугированию в течение 45 минут при 12000 об/мин для более тщательной очистки.

Финальным этапом очистки была фильтрация через фильтры «белая и красная лента» повторяющаяся 2 – 3 раза. После была проведена фильтрация через фильтр «красная лента» под вакуумом с использованием воронки Бухнера.

Суммарным итогом всех этих действий было получение 20% рабочего раствора перги, очищенного от всех балластных примесей, высокомолекулярных соединений и нежелательных компонентов. Теперь возможно проведение манипуляций с целью выделения чистых пептидных фракций, пригодных для дальнейшего анализа.

2.2.2 Метод Лоури

Метод Лоури является одним из основных методов определения количественного содержания белка в пробе. В данной работе этот анализ является промежуточным и выполняется после каждого этапа исследования. Основной целью является постоянная оценка содержания как белка в целом, так и пептидов в частности на каждом этапе очистки и подготовки финального препарата.

Он основан на взаимодействии ионов меди с пептидной связью и дальнейшей реакции с реактивом Фолина. Результатом этого взаимодействия является образование молибденовой сини. Оптическая плотность полученной смеси будет свидетельствовать об определенной концентрации в образце соединений белковой природы. Измерение происходит на длине волны $\lambda = 750\text{нм}$, так как на этой длине изменение концентрации белка линейно зависит от оптической плотности. Концентрация определяется по заранее построенной калибровочной прямой. Калибровочная прямая строится по БСА с известной концентрацией (10 – 100мкг/мл). Исследуемый образец при необходимости нужно разбавить, чтобы он попал в область максимальной чувствительности метода[14].

Анализ осуществляется следующим образом: к 0,5 мл исследуемого образца прибавляется 1 мл реактива С (1 часть реактива А (0,5%-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м растворе тартрата или цитрата натрия) на 50 частей реактива В (2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH)). Смесь интенсивно перемешивается и инкубируется при комнатной температуре 10 минут.

После инкубации к смеси приливается 100 мкл реактива Фолина, повторно перемешивается и снова инкубируется при комнатной температуре, но уже 40 минут. По прошествии времени инкубации происходит замер оптической плотности на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны $\lambda = 750$ нм. Расчет концентрации белка в пробе проводили по уравнению калибровочной прямой.

2.2.3Проба Селиванова

Даная реакция является качественной реакцией на присутствие углеводов (в основном фруктозы и других кетоз). Так же как и метод Лоури данная реакция является промежуточной и выполняется на каждом этапе проведения эксперимента. Она основывается на способности кетоз при нагревании взаимодействовать с соляной кислотой и в присутствии резорцина образовывать соединение вишнево-красного цвета. Интенсивность окраски будет свидетельствовать о наличии в пробе углеводов, в частности кетоз. Альдозы реагируют медленнее и образуют бледно-розовую окраску, либо вообще не образуют ее. Используя полученные результаты оптической плотности, определяется содержание углеводов по заранее построенной калибровочной прямой[14].

Анализ осуществляется следующим образом: к 0,5 мл исследуемого образца прибавляется 0,5 мл 0,1% спиртового раствора резорцина и 1,5 мл соляной кислоты. После тщательного перемешивания смесь инкубируется на водяной бане в течение 8 минут при температуре 80°C. После инкубации проводится замер оптической плотности на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны $\lambda = 490$ нм. Расчет концентрации фруктозы в пробе проводили по уравнению калибровочной прямой.

2.2.4 Ультрафильтрация

Ультрафильтрация – мембранное разделение и дальнейшее концентрирование молекул, осуществляемое при разности давления до и после мембраны. Это метод дальнейшей очистки рабочего раствора перги от соединений большой и средней молекулярной массы. В нашем случае используется такой вариант ультрафильтрации, как фильтрация в тангенциальном потоке. Она осуществляется на установке Vivaflow.

Данная установка состоит из нескольких компонентов. Для обеспечения фильтрации необходимы резервуар для исходного раствора, перистальтический насос, собственно мембрана (с заданным размером пор), имеющая предмембранное и постмембранное пространство, резервуар для фильтрата или отходов и система трубок с датчиком давления. При включении насоса исходный раствор по системе трубок поступает в фильтр. Жидкость с высокой скоростью движется вдоль мембраны в предмембранном пространстве. Молекулы с размером, меньшим, чем размер пор в мембране, вместе с растворителем попадают в постмембранное пространство и вместе с потоком перетекают в другой резервуар, предназначенный для фильтрата. Крупные молекулы, не прошедшие через мембрану, вместе с обратным потоком возвращаются в исходный резервуар. Преимуществами данного метода являются самоочистка мембраны (сильный поток растворителя уносит с поверхности мембраны непрошедшие молекулы, что позволяет использовать ее многократно) и концентрирование фильтруемого раствора (прошедшие через поры молекулы уносятся потоком растворителя, обеспечивая его отток). Для корректной работы установке необходимо постоянное поддержание давления примерно в 2,5 Бар. Контроль и регулировка давления осуществляется изменением скорости вращения перистальтического насоса. Имея мембраны на 5 кДа и 10 кДа можно обеспечить разделение молекул с массой 0-5 кДа и 5-10кДа, что в нашем

случае позволит отделить высокомолекулярные соединения (белки) и свободные аминокислоты от пептидов[27].

Перед работой на установке Vivaflow необходимо провести подготовительные операции. Мембрану необходимо трижды промыть. Первый раз мембрана промывается дистиллированной водой для удаления возможных остатков предыдущих процессов фильтрации. Второй раз мембрана промывается 0,5 н NaOH для удаления трудноотмываемых молекул. Третий раз мембрану необходимо снова промыть дистиллированной водой для удаления остатков щелочи и других посторонних компонентов. После всех проделанных процедур можно приступить непосредственно к фильтрации. В исходный резервуар заливается рабочий раствор (25% очищенный ранее раствор перги), включается насос, выставляется необходимое давление и фильтрат собирается в подготовленную емкость. При отметке жидкости в 65-70 мл в исходном резервуаре фильтрация останавливается. Далее необходимо снова промыть мембрану трижды, как это описано выше. После промывки мембрана консервируется 35% этиловым спиртом.

2.2.5 Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография – более частный вариант ионной хроматографии. Она основана на разделении ионов и других полярных молекул в зависимости от их зарядов. Данный метод позволяет разделить почти любые заряженные ионы и молекулы. Можно разделить и крупные (белки) и мелкие (аминокислоты и нуклеотиды). В нашем случае ионообменная хроматография – это метод разделения пептидов и углеводов. Проведение данного разделения обусловлено необходимостью очистки отфильтрованных на установке Vivaflow пептидных фракций от присутствующих в растворе углеводов.

Суть разделения заключается в том, что заряженные частицы,

находящиеся в подвижной фазе данной системы (элюенте), способны взаимодействовать с ионообменником на неподвижной фазе (сорбенте) и оставлять определенно заряженные ионные группировки, в свою очередь, забирая противоположные ионы. Ионообменники, привязанные к сорбенту, в зависимости от заряда, могут быть двух видов: анионообменники и катионообменники. В случае анионообменной хроматографии, задерживаются отрицательно заряженные молекулы. Это обусловлено тем, что носитель имеет положительно заряженные функциональные группы. При катионообменной хроматографии происходит все наоборот. Задерживаются положительно заряженные частицы, так как неподвижная фаза заряжена отрицательно. Перед проведением хроматографирования необходимо точно знать заряды разделяемых веществ и выбрать подходящий тип ионообменника[2].

При проведении ионообменной хроматографии в данном исследовании использовались слабые ионообменники. В качестве матрицы (носитель + ионообменник) для катионной хроматографии использовалась СМ-целлюлоза, а для анионной – DEAE-целлюлоза. Оба ионообменника в первоначальном виде представляет собой сухой белый порошок. Перед его использованием необходимо провести некоторые манипуляции, необходимые при подготовке ионообменника к работе. К таким манипуляциям относят промывку и преформирование. Промывка – процесс подготовки любого ионообменника для очистки от разрушенных гранул и других загрязнений. Некоторую навеску сухого ионообменника необходимо залить дистиллированной водой. Тщательно перемешав, ионообменник необходимо оставить для набухания в течение суток. После набухания его необходимо взмутить, и дать осесть неразрушенным гранулам целлюлозы. Когда целые гранулы осядут, удаляются не осевшие частицы разрушенных гранул и другой посторонний мусор, который мог попасть к ионообменнику. Удаление происходит путем декантации верхнего мутного слоя жидкости. Данную операцию необходимо повторить не менее пяти раз, пока не станут

различимы гранулы целлюлозы, и пока верхний слой жидкости не станет прозрачным, без видимых загрязнений. Далее необходимо провести преформирование. Преформирование можно считать процессом активации ионообменника. Оно прodelывается следующим образом: после оседания гранул целлюлозы, полностью удаляется верхний слой жидкости. Далее, емкость с ионообменником заполняется 0,5 М раствором HCl примерно на час. Это необходимо для обеспечения полной ионизации имеющихся на носителе ионогенных групп. У данного этапа есть побочный дефект. Часть исходных ионов OH^- , находящихся на носителе заменяется на ионы Cl^- , и необходимо вернуть вместо них исходные. Поэтому, далее необходимо промыть ионообменник и залить его 0,5 М раствором NaOH так же на час. Результатом этого действия будет возвращение ионов OH^- на исходное место. Процесс преформирования на этом считается законченным, ионообменник промывается водой до установления нейтрального pH, и подвергается дальнейшим манипуляциям.

Для эффективного разделения заряженных частиц достаточно сравнительно небольшое количество ионообменника. Необходимо подготовить примерно 5 мл носителя. Поскольку объем носителя не велик, то и колонку следует подобрать под необходимый объем. Колонка должна быть короткой и не слишком широкой. В нашем случае использовалась стеклянная колонка, шириной 1,75 см, объемом 10 мл, 5 из которых были заполнены ионообменником. На дно колонки необходимо поместить небольшой кружок фильтровальной бумаги, который будет предотвращать вытекание носителя. Поверх носителя также кладется кружок фильтровальной бумаги. Он будет препятствовать возможному взмучиванию сорбента, которое может произойти в результате неаккуратного нанесения образца и последующего элюента. Колонка заполняется носителем постепенно. Предварительно, он взмучивается в отдельной таре и частично помещается в колонку. После оседания, убирается лишняя жидкость, путем забора ее при помощи пипетки или пропускания через колонку. Далее в колонку помещается следующая

порция взмученного носителя. Верхний слой носителя, который уже находился в колонке, также необходимо немного взмутить, чтобы обезопасить ионообменник от образования границ раздела и перепадов плотностей. Вышеописанные действия повторяются до тех пор, пока не будет достигнут необходимый объем ионообменника. На носик колонки надевается трубка с фитингом, облегчающим сбор фракций и дальнейшее хранение колонки. Теперь колонка готова к работе и можно приступать к хроматографическому разделению.

Перед использованием колонку необходимо уравновесить. Уравновешивание происходит путем многократного пропускания через нее того буферного раствора, который будет осуществляться элюция на первом этапе хроматографирования. Следует пропустить объем буфера, не менее, чем десятикратный объем колонки. В случае катионообменной хроматографии (СМ-целлюлоза) колонку уравнивают и элюируют на первом этапе Na-ацетатным буферным раствором, концентрации 0,2 М с рН = 4,2. На втором этапе буферный раствор меняется на Na-цитратный, концентрации 0,2 М с рН = 6, на третьем – 0,2 М буфер tris-HCl с рН = 9. При анионообменной хроматографии (DEAE-целлюлоза) уравнивание и первоначальная элюция осуществляется буфером tris-HCl, концентрации 0,2 М с рН = 9. На втором этапе уже 0,2 М Na-цитратным буфером с рН = 6. В собранных фракциях определяется содержание белка, используя метод Лоури, а также содержание углеводов по пробе Селиванова.

2.2.6 Тест «Открытое поле»

Тест «Открытое поле» используют для регистрации форм поведения подконтрольных групп лабораторных крыс в ответ на новые, потенциально неизвестные стимулы. Обычно в таком тесте регистрируют двигательную активность (вертикальную и горизонтальную), груминг (уход за шерстью и покровами), обнюхивание отверстий, а так же дефекацию (выделение кала).

В данном тесте удобно наблюдать за любыми нарушениями в области моторных функций (шаткость, тремор и др.) [9].

Тестирование включает в себя два этапа. Это подготовительный этап и само тестирование. Подготовительный этап включает в себя ожидание сроков после манипуляций с экспериментальными животными. Такие процедуры как формирование новых подконтрольных групп, переселение особей из клетки в клетку, а так же любые метки необходимо проводить не менее чем за 24 часа до проведения эксперимента. Не менее чем за 1 час до непосредственного тестирования все подконтрольные группы крыс необходимо убрать в тихое, слабоосвещенное место. В этот период необходимо исключить кормление, перенос в руках и другие манипуляции. Введение препаратов или исследуемых образцов должны осуществляться стандартными методами, чтобы исключить случайную погрешность.

Само тестирование начинается с помещения животного в открытое поле. Существует два основных способа: помещение животного в центр или у стенки арены. Если тестирование продолжается в течение небольшого периода времени (4-5 минут), то помещение животного в центр арены не влияет на его последующее поведение, относительно поведения животного помещенного к стенке. Само животное можно выпускать непосредственно на пол арены, что является более целесообразным, поскольку создаются условия для регистрации такого эмоциогенного фактора, как неожиданность. Так же можно поместить животное на арену вместе с клеткой, в которой животное находилось до эксперимента в подготовительный период. Животное должно выйти через открытую дверцу и перемещаться по открытому полю. Но результатом этого способа будет комбинация тестов «открытое поле» и «темно-светлая камера». Данный вариант не подходит, так как он является более развернутым и менее конкретным. После тестирования каждого животного и подсчета параметров оценки необходимо протереть пол арены влажной губкой, для удаления следов и запаха тестируемого животного[41].

Регистрируемые параметры: горизонтальная двигательная активность

(ГДА) – критерий, который включает в себя пробежки животных по различным траекториям. Основной оценивающийся фактор – участие в перемещении всех лап. Пол арены разделен на сектора одинаковой площади, и за единицу перемещения принято считать один пересеченный сектор. Как только задние лапы животного заходят за разделяющую линию, считается, что пересечен один сектор. Регистрируют перемещения на периферии и в центре арены. Вертикальная двигательная активность (ВДА) – критерий, представленный стойкой животного на задних лапах. Причем регистрируется два вида, когда животное передними лапами опирается в стенку и когда держит лапы на весу. Уровень дефекации – критерий оценки эмоциогенности животного. Обычно, для определения дефекации считают количество болюсов, оставленных животным во время проведения эксперимента. Но следует учитывать, что существует множество факторов, способных оказать влияние на желудочно-кишечный тракт. Настоятельно рекомендуется подсчитывать не количество болюсов, а число актов дефекации. Обнюхивание отверстий – так же критерий оценки эмоциогенности животного, а так же его вторичной формы поведения. Регистрируются обнюхивание краев отверстий (расположенных в полу арены) или засовывание головы по глаза внутрь отверстий. Груминг – уход за шерстью и покровами. Его делят на две категории, быстрый (1-2 движения лап вокруг носа) и длительный (умывание области глаз с переходом на всю голову)[40].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение содержания белка и углеводов

На всем протяжении эксперимента требовалась постоянная оценка содержания в пробе белка и углеводов. После каждого этапа очистки рабочего раствора происходил замер этих параметров. Как описывалось ранее, для этого использовались метод Лоури и реакция Селиванова. Для определения по этим методам были построены калибровочные прямые, а также заданы уравнения, которые описывают зависимость оптической плотности от содержания того или иного компонента в пробе.

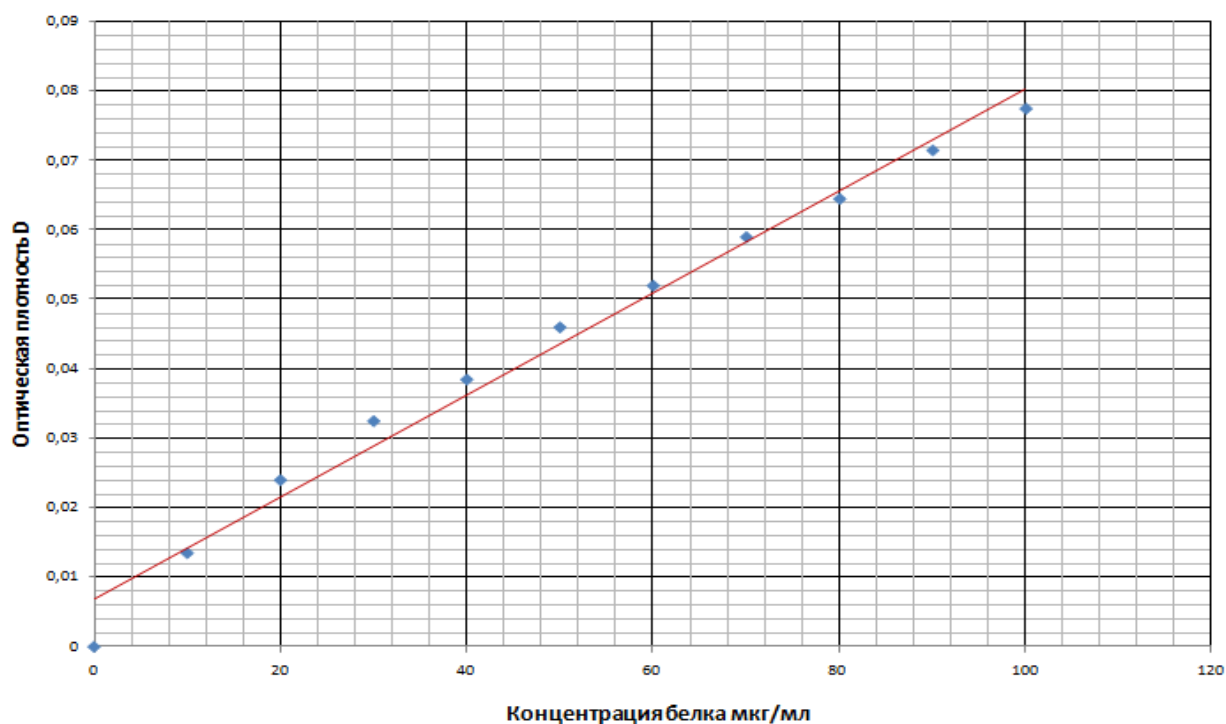


Рис. 1. Калибровочная прямая зависимости оптической плотности от содержания белка в пробе.

Калибровочная прямая для определения белка была построена с использованием раствора БСА (бычий сывороточный альбумин) заданной концентрации. Найдено уравнение, описывающее упомянутую выше

зависимость. Оно представлено следующим образом: $Y = (7.3409091 \cdot 10^{-4}) \cdot X + 0.0068409$, где Y – оптическая плотность, а X – содержание белка в пробе (мкг/мл). Использование этого уравнения обеспечивает точное нахождение искомой концентрации белка или пептидов.

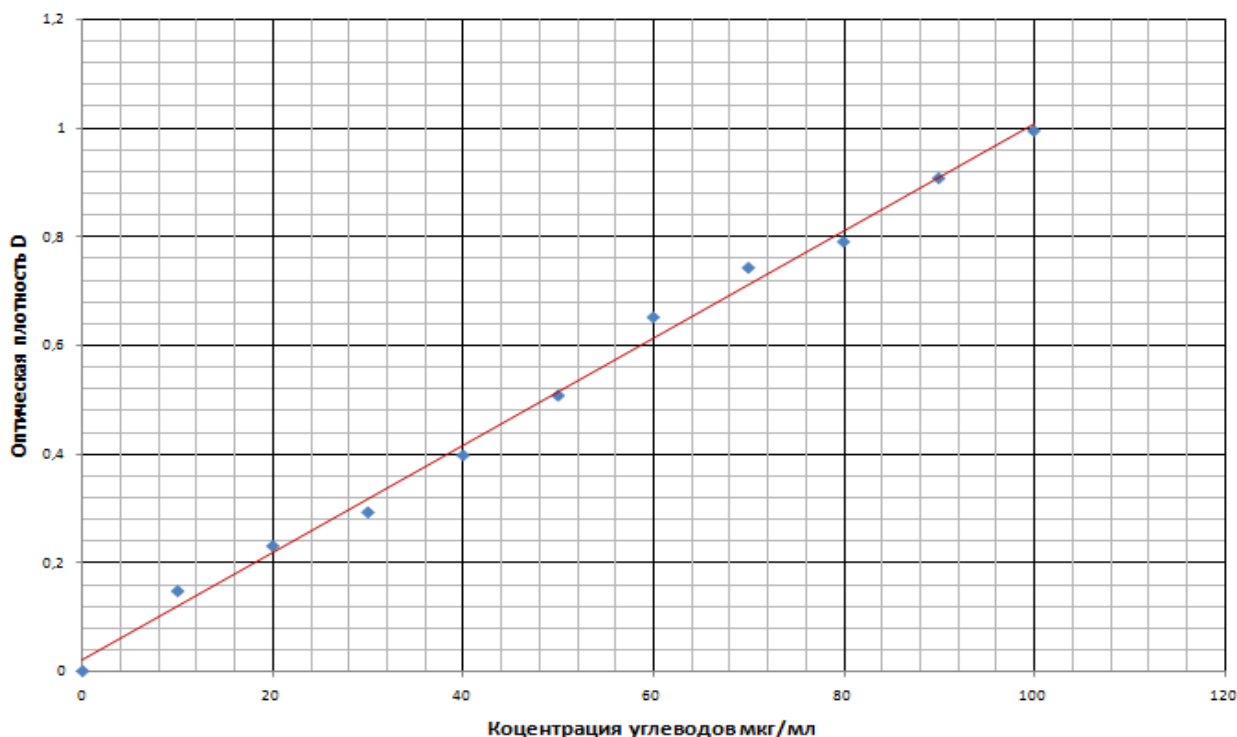


Рис. 2. Калибровочная прямая зависимости оптической плотности от содержания углеводов в пробе.

Вторая калибровочная прямая, необходимая для определения углеводов, также была построена заранее. Для нее использовался стандартный раствор фруктозы (100 мкг/мл), разбавленный до необходимой концентрации. Как и в случае с белком, было найдено уравнение зависимости содержания углеводов от оптической плотности: $Y = 0.0098582 \cdot X + 0.0213636$, где Y – значение оптической плотности, а X – искомая концентрация углеводов.

После каждого этапа очистки из раствора забиралась аликвота, которая разбавлялась для попадания в диапазон наибольшей чувствительности. В каждом разбавлении определялось содержание белка методом Лоури и

содержание углеводов пробой Селиванова. Данные, полученные в результате этих проверок, занесены в таблицу 5.

Таблица 5.

Содержание белков и углеводов на разных этапах очистки

Определяемый параметр	20% раствор перги	Раствор перги после центрифугирования	Раствор перги после ультрафильтрации	Степень очистки
Содержание белка	~9400 мкг/мл	~9200 мкг/мл	~3000 мкг/мл	~3.13 раза
Содержание углеводов	~15900 мкг/мл	~15400 мкг/мл	~4100 мкг/мл	~3.75 раза

Из данной таблицы видно, что процесс центрифугирования способствует очистке исходного раствора в очень малой степени. В свою очередь, ультрафильтрация – это наиболее подходящий метод очистки смеси от высокомолекулярных соединений (белки и углеводы) и соединений, обладающих наименьшей молекулярной массой (свободные аминокислоты). Суммарным итогом проделанных операций является очистка от исходного раствора от белков примерно в 3.13 раза, и очистка от углеводов в 3.75 раза. Продукт манипуляций, описанных в пункте 2.2, представлен концентрированным раствором, с массой компонентов 5-10 кДа. Дальнейшим этапом будет проведение ионообменной хроматографии для выделения чистых пептидных фракций.

3.2 Хроматографическое разделение

На колонку микродозатором наносился определенный объем профильтрованного концентрированного раствора перги, приготовленный в

соответствии с методикой, описанной в пункте 2.2. Он представляет собой смесь пептидов, углеводов, пигментов и других веществ с массой от 5 до 10 кДа. После впитывания нанесенного образца в верхний слой ионообменника в колонку наносился начальный элюент и обеспечивался его постоянный приток. Сразу после нанесения образца обеспечивался сбор фракций объемом 1.5 мл для дальнейшего анализа.

Для катионообменной хроматографии колонка набита CM-целлюлозой. Ее уравнивают и элюируют Na-ацетатным буферным раствором, концентрации 0,2 М с pH = 4,2. После сбора восьмой пробирки, буферный раствор меняется на Na-цитратный, концентрации 0,2 М с pH = 6. После сбора пятнадцатой на 0,2 М буфер tris-HCl с pH = 9. Собирается двадцать пробирок и в них определяется содержание пептидов и углеводов. Пробирки, содержащие чистые фракции пептидов, отбираются для дальнейшего анализа.

При анионообменной хроматографии колонка набита DEAE-целлюлозой. Уравнивание и первоначальная элюция осуществляется буфером tris-HCl, концентрации 0,2 М с pH = 9. После сбора восьмой фракции оставшийся слой буфера удаляется и наносится 0,2 М Na-цитратный буфер с pH = 6. Собирается 15 фракций.

3.3 Катионообменная хроматография

3.3.1 Подбор оптимальной дозы наносимого на колонку раствора перги

Для эффективного разделения необходимо найти оптимальный объем наносимого на колонку раствора перги. Существует теория, что углеводы, которые содержатся в растворе, влияют на сорбцию пептидов на ионообменник. Избыточное количество углеводов в смеси негативно сказывается на способности пептидов сорбироваться на носителе. Углеводы «мешают» пептиду взаимодействовать с ионообменником. Для проверки

данной теории были использованы три фракции раствора перги разных объемов: 150 мкл, 300 мкл, 450 мкл. Каждая из фракций была нанесена на колонку. Результат был оценен и систематизирован.

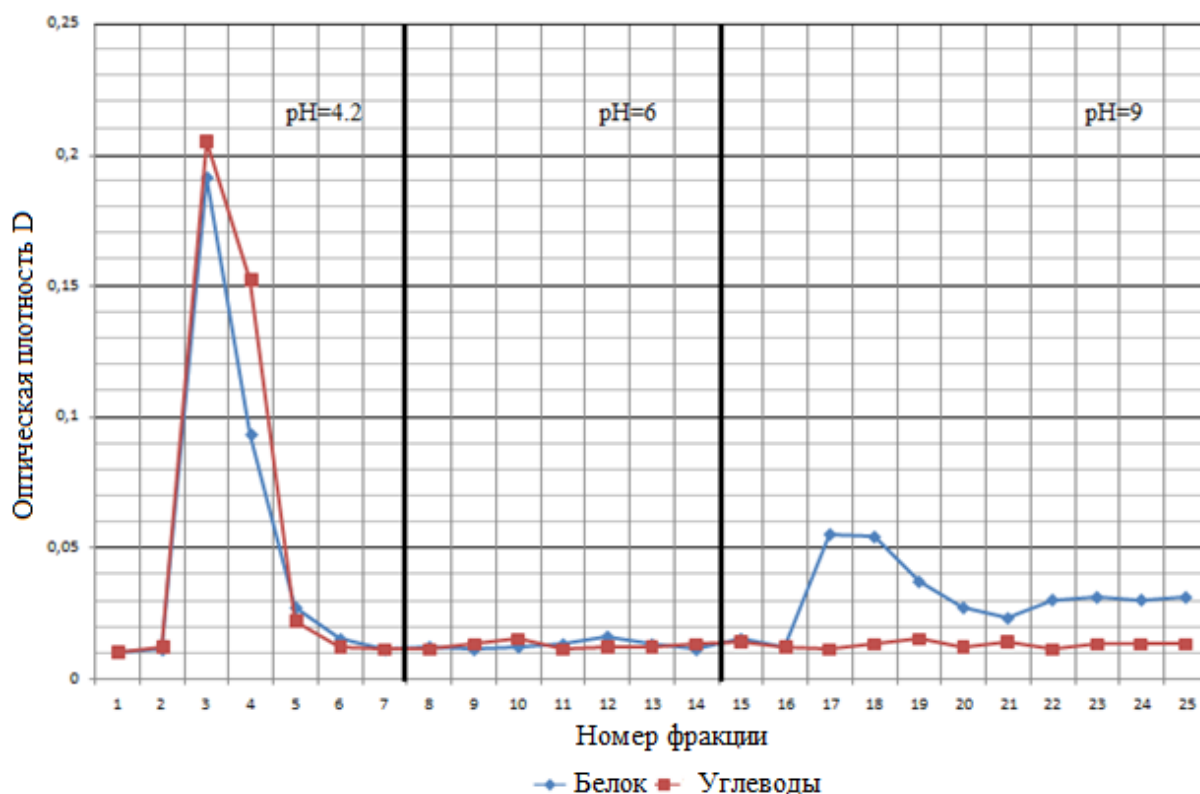


Рис 3. Профиль элюции пептидов при катионообменной хроматографии на СМ-целлюлозе, объём наносимой пробы - 150 мкл

При проведении разделения первой пробы с использованием трех буферов было отмечено, что вместо трех ожидаемых пиков пептидов было всего два. Первый пик – несвязавшиеся пептиды, вышедшие вместе с элюентом на первом этапе. Третий пик – связавшиеся и отмытые пептиды. Второй пик отсутствовал. Это может быть обусловлено тем, что при смене буферной системы на Na-цитратную, а следовательно и изменении pH, не происходит обмена между ионными группировками буферной системы и группировками ионообменника (пептидами). Вероятнее всего это происходит из-за неподходящих условий для элюции пептидов этим буфером. В силу нецелесообразности использования Na-цитратной буферной системы было принято решение исключить ее из эксперимента. Количество собираемых

фракций снижается до пятнадцати, и элюция будет осуществляться только Na-ацетатной и tris-HCl буферными системами.

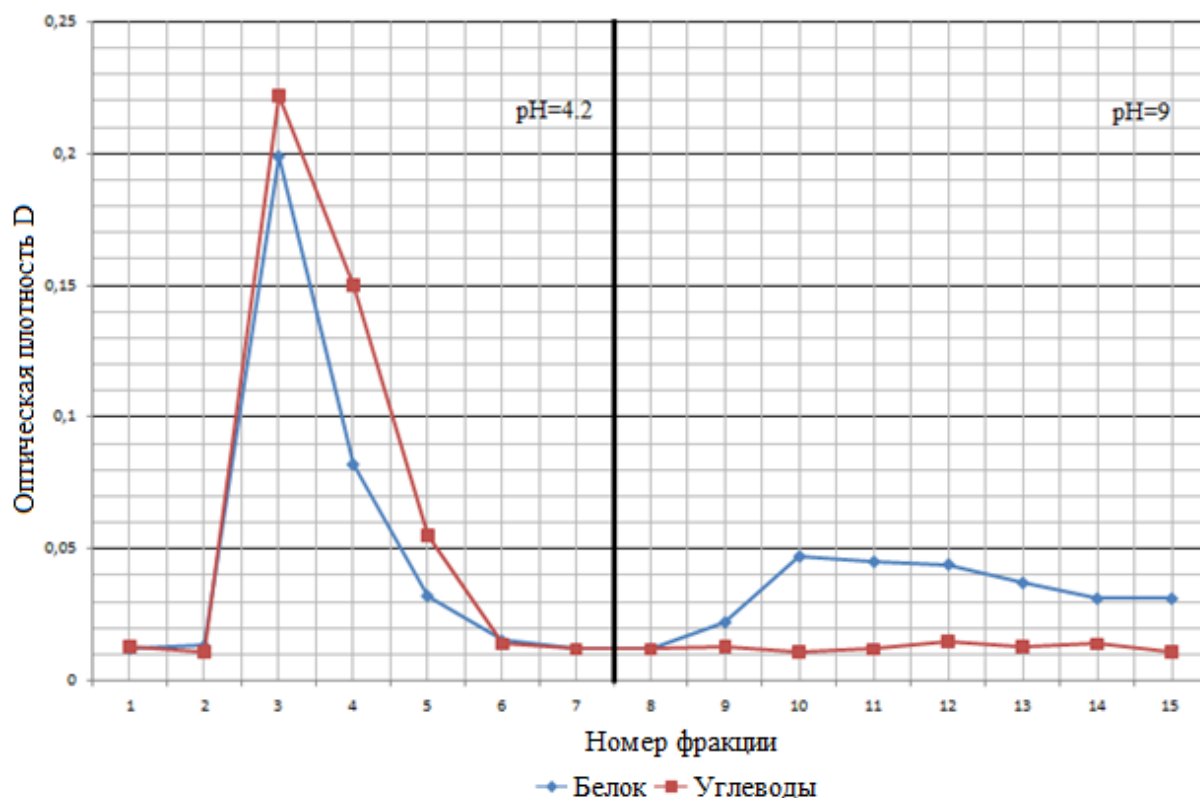


Рис 4. Профиль элюции пептидов при катионообменной хроматографии на СМ-целлюлозе, без Na-цитратной буферной системы, объём наносимой пробы - 150 мкл

При разделении пробы с использованием двух буферов отмечены два пика. Первый – несвязавшиеся пептиды, второй – связавшиеся и омытые буфером tris-HCl, концентрации 0,2 М с pH = 9. Углеводы, пигменты и другие сторонние вещества выходят вместе с несвязавшимися пептидами. Выход пептидов во втором пике происходит не резко, а постепенно. Очищенные пептиды выходят в последних фракциях. После разделения с объемом наносимого образца в 150 мкл, необходимо провести подобные разделения с объемами образца, равными 300 и 450 мкл соответственно. После сбора пятнадцати фракций происходит определение белка и углеводов в каждой фракции методами Лоури и Селиванова соответственно. По результатам строятся профили элюции.

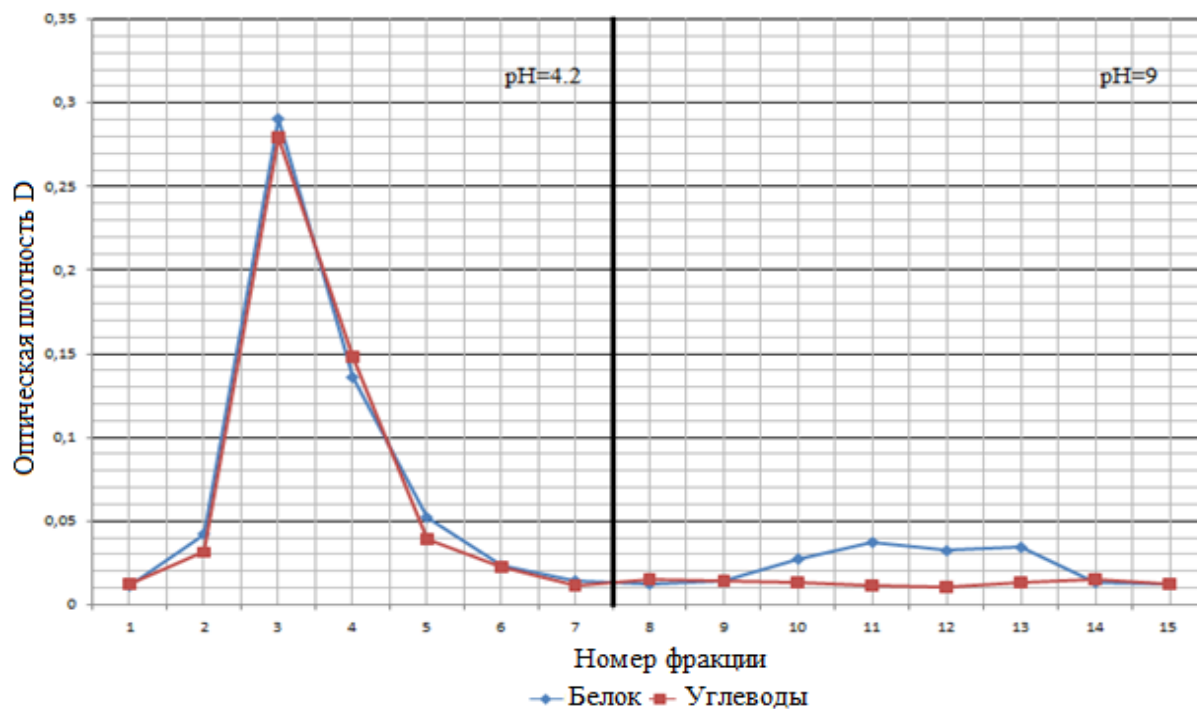


Рис 5. Профиль элюции пептидов при катионообменной хроматографии на СМ-целлюлозе, без Na-цитратной буферной системы, объём наносимой пробы - 300 мкл

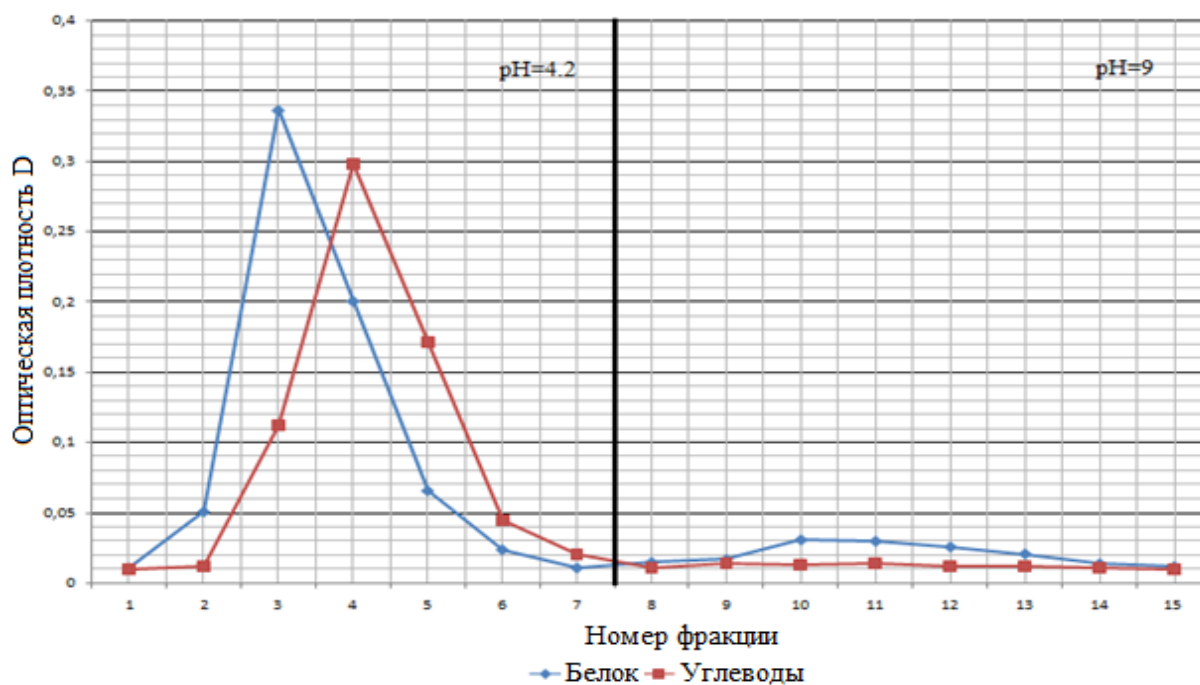


Рисунок 6. Профиль элюции пептидов при катионообменной хроматографии на СМ-целлюлозе, без Na-цитратной буферной системы, объём наносимой пробы - 450 мкл

После систематизации и анализ полученных данных была выявлена следующая закономерность: увеличение объема наносимой пробы отрицательно влияет на выход пептидов после смены буферной системы. Эта закономерность подтверждает теорию, описанную выше. Для наглядности был построен еще один график, отображающий эту зависимость.

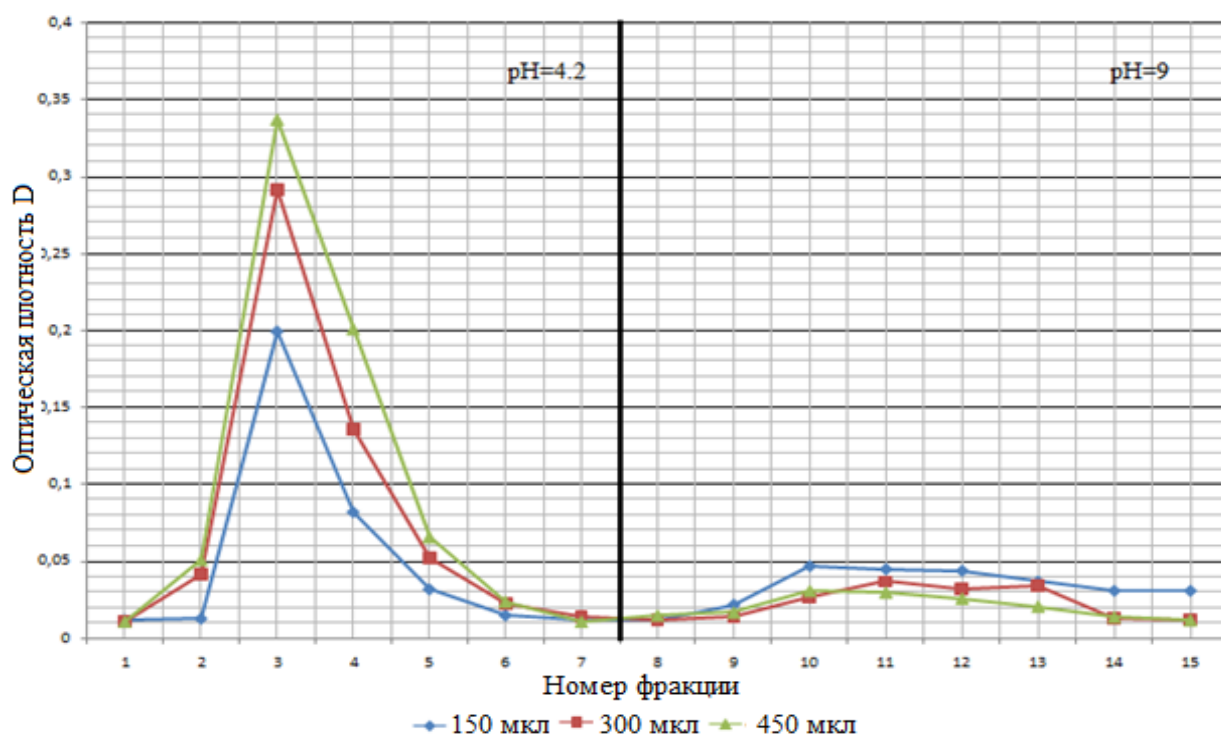


Рис 7. Совокупный профиль элюции пептидов при катионообменной хроматографии на СМ-целлюлозе, без Na-цитратной буферной системы, объем наносимой пробы – 150, 300 и 450 мкл

3.3.2Ход разделения

После сопоставления всех вышеописанных данных было принято решение использовать для хроматографии фиксированный объем наносимого препарата. Причем использовался наименьший объем, равный 150 мкл. Другие условия проведения хроматографии оставались неизменны: колонка уравновешена Na-ацетатным буферным раствором, концентрации 0,2 М с pH = 4,2. Элюция на первом этапе осуществляется им же. После сбора седьмой

фракции, буфер менялся на tris-HCl, концентрации 0,2 М с рН = 9 и собиралось еще восемь фракций. Фракции, в которых наблюдалось максимальное содержание пептидов (обычно это фракции 10, 11, 12, 13) сливались вместе для дальнейшего концентрирования путем лиофилизации с помощью установки для лиофильной сушки VaCo 2, обессоливания методосгель-фильтрации на сефадексеG-25 и повторной лиофилизации. Процесс хроматографического разделения повторялся неоднократно для сбора максимального количества фракций содержащих пептиды.

3.4 Анионообменная хроматография

Данный тип хроматографического разделения проходил на колонке, которая была заполнена DEAE-целлюлозой. Она была уравновешена буфером tris-HCl, концентрации 0,2 М с рН = 9. Элюция на первом этапе осуществлялась этим же буфером. После сбора седьмой фракции буфер менялся на 0,2 М Na-цитратный буфер с рН = 6.

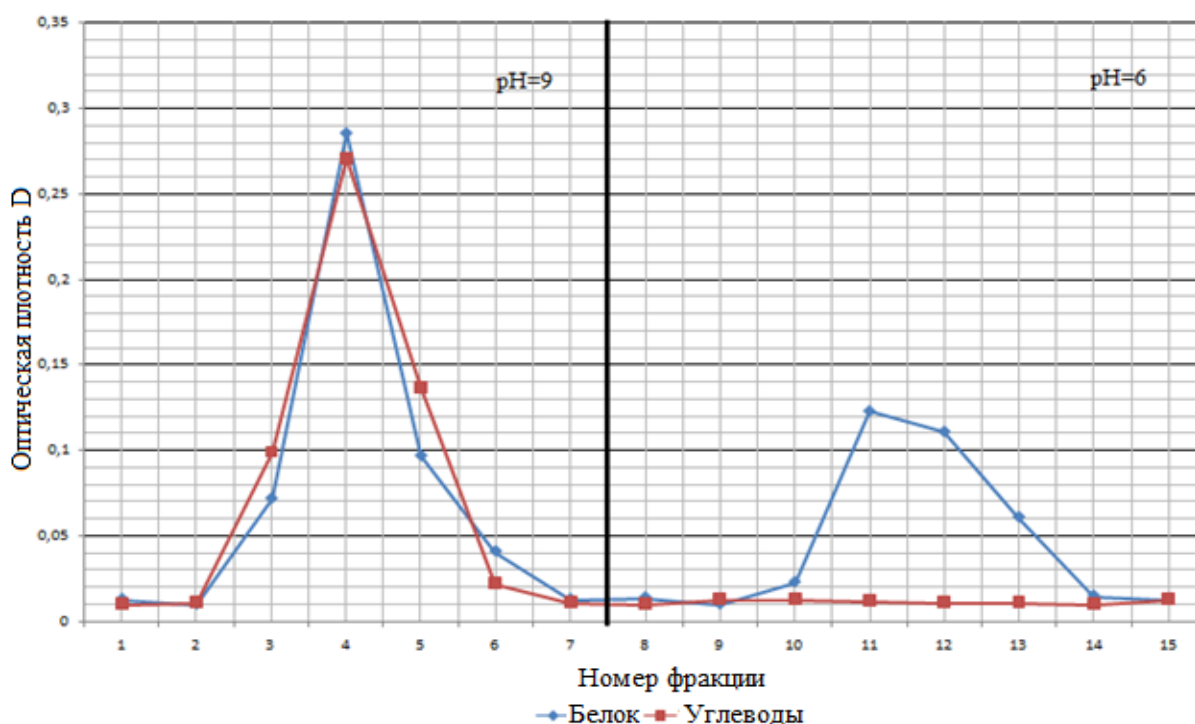


Рис 8. Профиль элюции пептидов при анионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, объём наносимой пробы - 150 мкл

В собранных фракциях было определено содержание белка и углеводов. Как и в случае катионной хроматографии было зафиксировано два пика выхода пептидов, первый – несвязавшиеся пептиды, второй – отмытые пептиды. Как ранее фракции с наивысшим содержанием пептидов (11, 12, 13) отбирались, сливались вместе и замораживались для хранения и дальнейшего использования. Процесс повторялся много раз для увеличения объема собранных пептидов.

3.5 Оценка метода ионообменной хроматографии

Хотя метод ионообменной хроматографии подходит для очистки пептидов от углеводов и других сторонних соединений, его нельзя считать эффективным. Если проанализировать пики вышедших пептидов, то можно заметить, что количество связавшихся, а в дальнейшем и отмытых, пептидов в два, а в некоторых случаях почти в три, раза меньше, чем количество несвязавшихся. Это обусловлено тем, что изначально пептиды заряжены нейтрально, и смена заряда на положительный или отрицательный происходит под действием условий среды. В нашем случае это изменение буферной системы, а соответственно и pH среды. Однако, заряд пептида, определяются и другими параметрами, что в нашем случае невозможно контролировать. Это означает что не все, необходимые нам пептиды, изменили свой заряд при изменении pH. Сорбции этих пептидов так же не произошло. Можно сделать вывод, что ионообменная хроматография не столь эффективна в данном случае, так как не позволяет осуществить максимальную сорбцию заряженных пептидов.

3.6 Исследование биологической активности пептидов перги

Исследование активности выделенных пептидов проводили на крысах. Крысы одинакового пола, возраста и веса были разделены на несколько

групп (таблица 6). Препарат вводился внутривентриально, в объеме 0,2 мл. Первой группе вводился физиологический раствор (контрольная группа). Второй группе вводился 20% раствор перги. Третьей – концентрированные пептиды, выделенные ранее. Для сравнения и оценки эффектов была подготовлена еще и четвертая группа. Крысам в ней вводили семакс. Это лекарственный препарат, относящийся к классу регуляторных пептидов и обладающий большим количеством биологических эффектов.

Таблица 6.

Исследуемые группы крыс

№ группы	Вводимый препарат
Группа 1	Физиологический раствор
Группа 2	Семакс
Группа 3	20% раствор перги
Группа 4	Пептиды перги, выделенные методом ультрафильтрации
Группа 5	Пептиды перги, очищенные методом катионообменной хроматографии
Группа 6	Пептиды перги, очищенные методом анионообменной хроматографии

3.6.1 Оценка двигательной активности тестом «Открытое поле»

Данный тест предназначен для исследования и оценки двигательной активности крыс. Он представляет собой площадку, диаметром 80 см, ограниченную по окружности. Она разделена на сектора одинаковой площади. В дне площадки расположены 16 отверстий (норок) для исследования исследовательской активности (норковый рефлекс). Длительность одного теста составляла 5 минут. При проведении теста оцениваются основные параметры, описанные в пункте 2.2.6. Для этого

используется поведенческий атлас для грызунов, в котором описаны основные позы животного и акты его поведения, которые необходимо фиксировать. Их совокупность будет полностью характеризовать целостное поведение при тесте «открытое поле». Усредненные данные теста «открытое поле» занесены в таблицу 7.

Таблица 7.

Результаты теста «Открытое поле»

Вводимый группе препарат	Латентный период, с	Число пересеченных квадратов	Стойки	Заглядывание в норки	Груминг	Число болосов дефекаций и уринаций
Физиологический раствор	35	20	8	4	3	7
Семакс (0,15 мг/кг)	22	21	12	4	6	2
20% раствор перги	37	22	7	5	3	8
Пептиды перги (ультрафильтрация) (0,15 мг/кг)	22	21	13	7	7	2
Пептиды перги (катионообменная) (0,15 мг/кг)	34	21	9	5	3	7
Пептиды перги (анионообменная) (0,15 мг/кг)	35	22	8	6	4	7

Если проанализировать данные, то можно заметить, что в случае использования семакса и пептидов, очищенных методом ультрафильтрации, происходят изменения в таких параметрах, как время латентного периода, число стоек, число актов груминга, а также число болюсов дефекации и уринации. Время латентного периода, т. е. замирания при попадании в открытое поле, уменьшается. Число болюсов дефекации и уринации тоже уменьшается, в то время как происходит увеличение актов груминга (умывания) и стоек. Это может свидетельствовать об уменьшении у крыс состояния тревожности и увеличении двигательной активности. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что пептиды перги обладают акнксиолитическим эффектом, т. е. успокаивающим действием. В случае пептидов, очищенных ионообменной хроматографией, видимых отличий не наблюдается, что может свидетельствовать об отсутствии в выделенных фракциях искомым групп пептидов.

3.6.2 Тест Порсолта на депрессивность

Данный тест предназначен для оценки двигательной активности крыс, помещенных в цилиндр, заполненный на треть водой. Диаметр цилиндра составляет 20 см, высота 40 см. Вода в цилиндре должна быть равна 27°C. В течение 6 минут животное находится в цилиндре. Фиксируются такие параметры как время активного и пассивного плавания, а также время иммобилизации. Полученные результаты занесены в таблицу 8.

Таблица 8.

Результаты теста Порсолта на депрессивность

Вводимый группе препарат	Время активного плавания, с	Время пассивного плавания, с	Время иммобилизации, с
Физиологический раствор	125±15,8	200,3±26,0	98,4±6,3

Семакс (0,15 мг/кг)	168,0±25	201,5±26,2	48,0±12,7
20% раствор перги	122±14	205,3±27	68,4±7,2
Пептиды перги (ультрафильтрация) (0,15 мг/кг)	174±16,3	201,7±23	46,8±5,4
Пептиды перги (катионообменная) (0,15 мг/кг)	123±13,8	203±25,1	70±6,5
Пептиды перги (анионообменная) (0,15 мг/кг)	121±14	205±26,3	72±7,7

Как и в случае теста «открытое поле», можно заметить изменения группам, которым вводились семакс и пептиды перги после ультрафильтрации. Существенных изменений во времени пассивного плавания не наблюдается. Однако происходит увеличение времени активного плавания и уменьшение времени иммобилизации. Согласно поведенческому атласу, эти факторы свидетельствуют о наличии антидепрессантного эффекта. Причем время иммобилизации в случае введения 20% раствора перги и пептидов, очищенных методом ионообменной хроматографии, тоже уменьшилось, следовательно, перга обладает похожим эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на полученных результатах можно сделать вывод что раствор, и выделенные из него пептиды обладают анксиолитическим и антидепрессантным эффектом, т.е. снижают состояние тревожности и оказывают общеуспокаивающее действие. Однако не все пептиды обладают данными свойствами. Использование ионообменной хроматографии не позволяет полноценно выделить нужную группу пептидов. Необходимо вести дальнейшее исследование с целью выделения фракции пептидов, обладающих необходимыми нам свойствами. Эти свойства можно использовать при разработке таких групп фармакологических препаратов, как анксиолитики и транквилизаторы.

В ходе выполнения ВКР были сделаны следующие выводы:

1. Разработан способ приготовления раствора перги и метод выделения и очистки пептидов из него
2. Показана неэффективность метода ионообменной хроматографии для разделения пептидов перги
3. Выявлены анксиолитический и антидепрессантный эффекты перги

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветисянт, Г.А. Разведение и содержание пчел / Г.А. Аветисянт.– Москва: «Колос», 1983. – 271 с.
2. Айвазов, Б.В. Практическое руководство по хроматографии / Б. В. Айвазов. – М.: Высшая школа, 1968. – 279 с.
3. Асафова, Н.Н. Физиологически активные продукты пчелиной семьи / Н.Н. Асафова, Б.Н. Орлов, Р.Б. Козин. – Нижний Новгород: Изд-во Ю.А. Николаев, 2001. – 368 с.
4. Астраускене, А.Э., Ботанический анализ перги / А.Э. Астраускене, А.Ю. Мачекас, К.В. Кадзяускене, Д.И. Кондротене.– Днепропетровск: Пчеловодство, 1990. – С. 1-6.
5. Бантишева, Л. Г. Продукты пчеловодства и наше здоровье / Л.Г. Бантишева.– Москва, 1992. – 448 с.
6. Белки / «Химическая энциклопедия» – изд. «Советская энциклопедия», М., 1988.
7. Борт, Р. Лечебная сила мёда прополиса, пыльцы и других продуктов пчеловодства / Р. Борт. – Харьков, 2016. – 96 с.
8. Бурдина, А.В., Биологически активные пептиды, выделенные из укропа пахучего / А.В. Бурдина, А.П. Ильина, О.Г. Куликова, Д.И. Мальцев, И.А. Ямсков, В.П. Ямскова.//Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – №3–С. 348-353.
9. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон.– Москва: "Высшая школа", 1991. –С. 119 -122.
10. Виноградова, Т. В. Пчела и здоровье человека / Т.В. Виноградова, Г.П. Зайцева. – М.: Россельхозиздат, 1966. – 288 с.
11. Глушков, Н.М. Цветочная пыльца, собираемая пчелами, и пути ее использования / Н.М. Глушков. – М.: Московский рабочий, 1964. – 152 с.

12. Гребенников, Е.А. Все о мёде / Е.А. Гребенников. – М.: Книжный дом, 2005.– 739 с.
13. Гринштейн, Дж. Химия аминокислот и пептидов / Дж. Гринштейн, М. Виниц, перевод с английского В.К. Антонова, Э.М. Бамдас, Ю.А. Овчинникова. – Москва: «Мир», 1966. – 821 с.
14. Доусон, Р. Справочник биохимика / Р. Доусон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
15. Дэвени, Т. Аминокислоты, пептиды и белки / Я. Гергей, Т. Дэвени, перевод с английского А.Н. Маца. – Москва: «Мир», 1976. – 364 с.
16. Еремия, Н.Г. Биохимический состав пыльцы / Н.Г. Еремия, Н.М. Еремия.// Матер. Всесоюзной конф. Днепропетровск.1998.– С. 19-30.
17. Зайцева, Г.П. Пыльца и перга химический и биологический состав / Г.П. Зайцева Т.В. Виноградова. // Пасека. Энциклопедия пчеловодства. – 2010. – С. 1-3.
18. Иванов, В.Г. Биологически активные пептиды и их будущее в медицине / В.Г. Иванов.– М.: Колос С 1982. – 418 с.
19. Иванов, Ф.В. Изучение активности некоторых ферментов цветочной пыльцы / Ф.В. Иванов. // Апиак-та. – 1984. - №19(3). – С. 7-13.
20. Иойриш, Н.П. Продукты пчеловодства и их использование / Н.П. Иойриш.– М.: Россельхозиздат, 1976. – 176 с.
21. Кривцов, Н.И., Лебедев В.И. Получение и использование продуктов пчеловодства / Н.И. Кривцов, В.И. Лебедев.– М.: «Нива России», 1993. – 285 с.
22. Лебедев, В.И. Биология мёдоносной пчелы / В.И. Лебедев, Н.Г. Билаш. – М.: Агропромиздат, 1991. – 236 с.
23. Мачекас, А.Ю. Исследование динамики изменений витаминов в законсервированной обножке. Апитерапия. Биология и технология продуктов пчеловодства / А.Ю. Мачекас, А.Э. Астраускене.// Мат. Всесоюз. Конф. Днепропетровск: ДГУ, 1988. – Ч.1.

24. Николаева, Ю. Н. Мёд, прополис, перга и другие продукты пчеловодства от всех болезней / Ю.Н. Николаева. – М.: Рипол Классик, 2011. – 192 с.
25. Пептиды / «Химическая энциклопедия» – изд. «Советская энциклопедия», М., 1988.
26. Синяков, А.Ф. Энциклопедия мёдолечения / А.Ф. Синяков.– М.: Авеонт, 2006. – 96 с.
27. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
28. Туников, Г.Н. Пчела и человек / Г.Н. Туников, Н.И. Кривцов, В.И. Лебедев. – М.: Колос С, 2006. – 181 с.
29. Хисматуллина, Н. З. Апитерапия / Н.З. Хисматуллина – Пермь: Мобиле, 2005. – 290 с.
30. Шабанов, П.Д. Фармакология пептидных препаратов / П.Д. Шабанов.// Мед.акад. журн. – 2008. – Т.8. – №4 – С. 1-12.
31. Шатаева, Л.К. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы) / Л.К. Шатаева, В.Х. Хавинсон, И.Ю. Ряднова – Санкт-Петербург: «Наука», 2003. – 222 с.
32. Шеметков, М.Ф. Продукты пчеловодства и здоровье человека / М.Ф. Шеметков, Д.К. Шапиро, И.К. Данусевич – Минск: Ураджай, 1987. – 104 с.
33. Энциклопедический словарь Брокгауза и Ефрона(статья «Пчёлы»).
34. Abu Taib Mohammad Mobarok Ali. Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori* / Abu Taib Mohammad Mobarok Ali, Mohammad 50 NurulHaqueChowdhury, Mohammad Saad Al Humayyd // Tropical gastroenterology. – 1991. – Vol. 12 (3). – P. 139-142.
35. Casteels, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst // The EMBO Journal. –1989. – Vol. 8 (8). – P. 2387-2391.
36. Coast, G.M. Neuropeptide control of fluid balance in insects / G.M.Coast, C.S. Garside // Ann NY Acad Sci. – 2005. – Vol. 1040. – P. 1-8.

37. Dalbey, R.E. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes: A new protease family /R.E.Dalbey, G.Heijne // Trends. Biochem.Sci. – 1992. –Vol.17 (11). – P. 474-478.
38. Elekonich, M.M. Insect allatotropins belong to a family of structurally-related myoactive peptides present in several invertebrate phyla / M.M.Elekonich, F.M.Horodyski// Peptides. – 2003. – Vol. 24. – P. 1623-1632.
39. Free, J.B.Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony / J.B.Free, I.H.Williams// Anim.Behav. – 1975. –Vol. 23. – P.650-675.
40. Gould, T.D. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice / T.D.Gould // Neuromethods. – 2009. – Vol. 42. –P. 978-1007.
41. Hall,C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity /C.S. Hall// J. comp. physiol. Psychol.– 1936. – Vol. 22. –P. 345-352.
42. Li, J. Honeybee (*Apis mellifera ligustica*) drone embryo proteomes / J. Li, Y. Fang, L. Zhang, D. Begna // Insect Physiol.– 2011. – Vol. 57 (3). – P. 372-384.
43. Miklos, Gabor Epigenomic communication systems in humans and honey bees: from molecules to behavior / G. Miklos, R. Maleszka// HormBehav.– 2011. – Vol. 59 (3). – P. 399-406.
44. Nassel, D.R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: Multiple roles as neuromodulators and neurohormones / D.R.Nassel //ProgNeurobiol. – 2002. –Vol. 68. – P. 1-84.
45. Predel, R. Wegener C. Biology of the CAPA peptides in insects /R. Predel//Cell Mol Life Sci. –2006. – P. 1-14.
46. Rueppell, Olav Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.) / O. Rueppell, C. Bachelier, M.K. Fondrk, R.E. Page // ExpGerontol.– 2007. – Vol. 42(10). – P. 1020-1032.
47. Selsted, M. E. Primary structures of three human neutrophil defensins / M.E. Selsted, S.S. Harwig, T. Ganz, J.W. Schilling, R.I. Lehrer // J Clin Invest. – 1985. –Vol. 76 (4). – P. 1436-1439.

48. Shrimpton, C.N. Soluble neutral metallopeptidases - physiological regulators of peptide action / A.I. Smith, C.N. Shrimpton // *J. Peptide Sci.* – 2000. – Vol. 6 (6). – P. 251-263.
49. Simone-Finstrom, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees / M. Simone-Finstrom, M. Spivak // *Apidologie.* — 2010. — Vol. 41 (3). — P. 295-311.
50. Sossin, W.S. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging / W.S. Sossin, J.M. Fisher, R.H. Scheller // *Neuron.* – 1989. – Vol. 2. – P. 1407-1417
51. Tautz, J. The buzz about bees / J. Tautz // Heidelberg: Springer. – 2008. – P. 284.
52. Veenstra, J.A. Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors / J.A. Veenstra // *Arch Insect Biochem Physiol.* – 2000. – Vol. 43. – P. 49-63.
53. Wu, Q. Signaling and function of insulin-like peptides in insects / Q. Wu, M.R. Brown // *Annu Rev Entomol.* – 2006. – Vol. 51. – P. 1-24.

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
Карп Г.А. Карпова
« 2 » 11 2016 г.

Задание

По ВКР студента Седякина Вячеслава Алексеевича

Тема работы: "Исследование физико-химической и биологической активности пептидов перги"

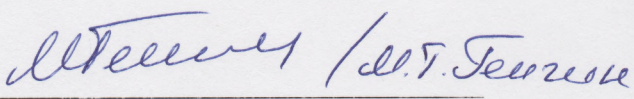
Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 2016 г. № 1191 а/о

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

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения, глав обзора литературы («Перга, ее состав и свойства»; « Происхождение перги и ее значение»; « Биологический состав перги»; « Химический состав перги»; « Физико-химические и биологически активные пептиды»; « Биологически активные пептиды и их роль»; « Физико-химические свойства пептидов»; « Пептиды перги»)	Ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Осваивание и отработка основных биохимических методов, которые могут быть использованы в процессе исследования	Сентябрь 2016-ноябрь 2016	Выполнено
3	Подготовка рабочего раствора	Март 2017-апрель 2017	Выполнено
4	Очистка рабочего раствора	Март 2017-апрель 2017	Выполнено
5	Выделение пептидных фракций	Март 2017-апрель 2017	Выполнено
6	Исследование влияния выделенных пептидов на живые системы	Март 2017-апрель 2017	Выполнено
7	Систематизация и анализ результатов	Апрель 2017-май 2017	Выполнено
8	Написание глав «Материалы методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заклучение»	Апрель 2017-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания « 2 » 11 2016г.

Руководитель 

Задание принял к исполнению 