

На правах рукописи

ГРИШИНА ЖАННА ВАЛЕРЬЕВНА

**БЕЛКИ, ПЕПТИДЫ И ФЕРМЕНТЫ ИХ ОБМЕНА
В ОНТОГЕНЕЗЕ ЛИЧИНОК ТРУТНЕЙ И РАБОЧИХ ПЧЕЛ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Боровск -2017

Работа выполнена на кафедре биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Генгин Михаил Трофимович

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук
Бурмистрова Лилия Александровна
Директор ФГБНУ "Научно-исследовательский институт пчеловодства"

доктор биологических наук, профессор
Кутузова Нина Михайловна
зав. кафедрой биохимии, молекулярной биологии и генетики ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева»

Защита состоится "29" марта 2017 г. в ___ час. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 006.030.01 в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных» по адресу: Адрес: 249013, Калужская область, г. Боровск, пос. Институт, ВНИИФБиП, Тел.:8(495)996-34-15, факс: 8(48438)4-20-88, E-mail: bifip@kaluga.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания животных.

Автореферат разослан « __ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Решетов Вадим Борисович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Применение продуктов пчеловодства (маточного молочка, трутневого расплода, меда, пыльцы, перги, воска, прополиса) в качестве природных аналогов синтетических лекарств в медицине, спорте, сельском хозяйстве практикуется уже довольно продолжительное время (Макарова, В.Г., 2000; Ериков В.М., Пунякин А.К., 2008; Дубцова Е. А., 2009; Zümrüt Açığöz, Banu Yücel, 2016).

Препараты личинок трутневого расплода широко применяются в спорте в качестве пищевых добавок, богатых аминокислотами и витаминами (Ериков В.М., Пунякин А.К., 2008). В медицине известно использование препаратов из личинок пчел ввиду их положительного действия в широком спектре заболеваний (Дубцова Е. А., 2009). Присутствие анаболического эффекта у препаратов личинок расплода пчел обуславливает их применение в сельском хозяйстве в качестве природного аналога химических гормонов (Zümrüt Açığöz, Banu Yücel, 2016).

Ввиду выше сказанного, становится очевидным тот факт, что продукты пчеловодства занимают одну из лидирующих позиций среди других натуральных средств, которые могут стать безопасной и доступной альтернативой химическим препаратам (Макарова, В.Г., 2000). В природе нет аналогов, которые бы могли конкурировать с продуктами пчеловодства по сбалансированности таких биологически активных веществ как аминокислоты, пептиды, белки, гормоны, углеводы, липиды, витамины, минеральные вещества, способных влиять на множество функций организма (Макарова, В.Г., 2000; Лазарян Д. С., 2002; Кривцов Н. И., 2004).

Особую роль во всех вышеперечисленных физиологических эффектах, которыми обладают препараты из продуктов пчеловодства, занимают вещества, обладающие регуляторными свойствами, к которым относятся, в том числе, и регуляторные пептиды. Уровень данных пептидов в клетке в большой степени зависит от активности протеолитических ферментов (протеаз), под контролем которых находятся большое количество обменных процессов в развивающихся личинках и в любом другом живом организме. Протеазы, в последнее время, рассматриваются не только как инструмент распада белка, поставляющего аминокислоты для синтеза новых белковых молекул, но и как важнейший регулирующий фактор обмена веществ (Гомазков О. А., 1993; Ашмарин И. П., 2001). Акт гидролиза пептидной связи приводит к появлению нового белка (пептида) с другими физико-химическими и биологическими свойствами, что приводит к изменению ключевых процессов метаболизма в клетке (Гомазков О. А., 1993; Ашмарин И. П., 2001; Хавинсон В.Х., 2003).

Ввиду того, что регуляторные пептиды представляют собой отдельный класс физиологически активных веществ, играющих ключевую роль в регуляции и реализации разнообразных функций организма, их изучению в течение уже многих лет уделяется большое внимание (Ament S. A., Corona M., 2008; Antonova Y., Arik A. A., 2012; Ying Wang, S. V. Azevedo, 2013). К тому же, за последние десятилетия сформировалась концепция о функциональной непрерывности, регуляторном континууме, состоящем из белков, пептидов, ферментов и

сопряженных с ними межклеточных сигнализаторов небелковой природы (Ашмарин И.П., Обухова М.Р., 1986; Ашмарин И. П., 2001).

В то же время, регуляторные пептиды насекомых остаются недостаточно изученными, поскольку большой круг исследователей концентрирует свое внимание на изучении антимикробных пептидов насекомых (Chmielewski M., Buczek K., 2007; Ravi S., Jeyashree A., 2011). Это касается и регуляторных пептидов личинок трутневого расплода и рабочих пчел (Генгин М.Т., Моисеева А.А., 2013; Генгин М.Т., Гришина Ж.В., 2015).

Медоносная пчела в последнее время вызывает большой интерес исследователей как объект для изучения молекулярных механизмов регуляции клеточных процессов, поскольку в пчелиной семье имеются особи как с гаплоидным, так и с диплоидным набором хромосом. Причем, последние, обладая одинаковым геномом, не только затрачивают разное время на эмбриональное развитие, но и обладают запрограммировано различной продолжительностью жизни (Мишуковская Г. С., 2008; Ying Wang, Azevedo S. V., 2013).

В качестве объекта исследования использовали личинки трутней и рабочих пчел. На личиночной стадии их масса увеличивается в полторы тысячи раз за 6-7 суток, что позволяет говорить о наличии высокоэффективных регуляторных элементов, контролирующих чрезвычайно высокую интенсивность обмена веществ, не имеющей аналогов в живой природе (Бурмистрова Л.А., 2005; Будникова Н.В., 2009). К тому же, в последнее время в литературе стали появляться данные о физиологических эффектах препаратов пептидов, полученных из личинок трутней.

Цель работы: изучение количественного и качественного состава пептидов, белков в личинках трутней и рабочих пчел разного возраста, с целью обнаружения этапа развития личинок с максимальным содержанием пептидов, для дальнейшего изучения их физиологических эффектов.

Для достижения цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить качественное и количественное содержание пептидов на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел.
2. Изучить качественный и количественный состав белков на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел.
3. Исследовать активность протеолитических ферментов метаболизма белков и пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел.
4. Выявить некоторые физиологические эффекты фракции пептидов, полученных из личинок трутней.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные, изложенные в диссертации, а также их анализ, систематизация и оценка результатов выполнены лично автором под руководством д.б.н., профессора Генгина М. Т.

Научная новизна работы. Впервые проведена сравнительная характеристика качественного и количественного состава белков и пептидов на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел. Впервые показаны закономерности изменения активности некоторых протеолитических ферментов, участвующих в метаболизме белков и пептидов на личиночной стадии трутней и

рабочих пчел. Впервые обнаружены анксиолитический, ноотропный эффекты пептидной фракции молекулярной массой до 5 кДа, полученной из личинок трутней.

Теоретическая и практическая значимость. Установленные закономерности изменения количества и состава белков личинок трутней (гаплоидный набор хромосом) и рабочих пчел (диплоидный набор хромосом) в процессе их развития дополняют представления об особенностях механизмов онтогенеза и закономерностях в обмене белков на личиночной стадии развития насекомых. Сравнительный характер исследований состава белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел может свидетельствовать о кастовой дифференцировке механизмов экспрессии белков и генеза регуляторных пептидов. Установленная положительная зависимость между уровнем регуляторных пептидов и активностью трипсиноподобной протеазы, а также между количественным содержанием белков и активностью катепсина D, подтверждает представление о роли каждого из исследуемых ферментов в метаболизме белков и пептидов в клетке. Выявленные закономерности количественного и качественного содержания пептидов в личинках разного возраста позволит использовать личинки с максимальным содержанием пептидов для дальнейшего изучения их физиологических эффектов, с целью созданию природных аналогов синтетических препаратов и использования их в фармакологии, медицине, спорте и сельском хозяйстве.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Онтогенез пчелы медоносной на стадии личинки сопровождается положительной динамикой (увеличением) общего количества белка и обратной динамикой (уменьшением) количества пептидов.
2. Установлены различия в характере изменения активности одного и того же протеолитического фермента в процессе развития личинок двух разных каст.
3. Выявлена положительная корреляция между количественным содержанием белка и активностью катепсина D, а также между количественным содержанием пептидов и активностью трипсиноподобной протеазы.
4. Фракция пептидов молекулярной массой до 5 кДа, выделенная из личинок трутневого расплода, обладает анксиолитическим и ноотропным действием.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов данного исследования основана на применении стандартных методик и сертифицированных приборов. Для проверки воспроизводимости результатов, все эксперименты выполнялись в 4-6 параллельных повторях. Полученные результаты интерпретировали в соответствии с известными литературными данными. Сформулированные нами выводы полностью основаны на полученном экспериментальном материале.

Материалы диссертации доложены на всероссийских и международных научно-практических конференциях: Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа – конференция молодых ученых, 16 - 21 апреля, 2012 года Пущино (тезисы). III Международная научная конференция «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии», 24-25

сентября, 2015 года. Днепропетровск, Украина (тезисы). II Международная научно-практическая телеконференция «Advances in Science and Technology», 25 декабря 2015 года (тезисы).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 6 статей в журналах, реферируемых ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из 7 разделов: введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы исследований, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения к применению результатов исследования. Работа изложена на 110 страницах, иллюстрирована 29 рисунками, 8 таблицами. Список литературы содержит 222 наименований на русском и иностранных языках.

Материалы и методы исследования.

Для исследований использовались личинки трутневого расплода 1, 2, 3, 4-5, и 6-7- суточного возраста и личинки рабочей пчелы 1, 2, 3, 4 и 5-6 суточного возраста. Личинки извлекали из сот, взвешивали на аналитических весах для определения их возраста, затем промывали дистиллированной водой для удаления следов корма и замораживали. Все операции производились на холоде.

Пробоподготовка. Исследование количественного и качественного состава белков и активность протеолитических ферментов проводили в 10%-ных экстрактах личинок: 1 г личинок гомогенизировали в 10 мл 0,9% NaCl, затем на рефрижераторной центрифуге в течение 30 минут при 10000 об/мин отделяли оставшиеся неразрушенные клетки и субклеточные структуры, отбирали супернатант и в нем определяли количественное содержание общего белка по стандартной методике Лоури (Lowry O.H., 1951), а также активность ферментов. Все операции по составлению инкубационной смеси проводили в ледяной бане при температуре 5-7°C, экстракт хранили в камере глубокой заморозки при -40°C (Генгин М.Т., Моисеева А.А., 2013; Генгин М.Т., Гришина Ж.В., 2015).

Для определения количественного содержания пептидов, готовили экстракты пептидов. Их получали путем осаждения белков из исходных 10% водных экстрактов с помощью 5 минутного кипячения с последующим центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 минут. Осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали как источник пептидов (Генгин М.Т., Моисеева А.А., 2013; Генгин М.Т., Гришина Ж.В., 2015). Концентрацию белков и пептидов в полученном экстракте определяли по методу Лоури (Lowry O.H., 1951).

Для исследования качественного состава пептидов и их физиологического эффекта проводили разделение белковой и пептидной фракций в исходных прокипяченных экстрактах методом гель - фильтрации, на стеклянной колонке 35*1,5 см, заполненной сефадексом G-25. На колонку, предварительно уравновешенную раствором 0,9% NaCl, наносили 500±50 мкл раствора белка (экстрактов личинок каждой стадии развития) с концентрацией 4 мг/ мл. Скорость элюции белков с колонки - 30 мл/час, собирали 30 проб по 2 мл. Параметры колонки (внутренний и свободный объем) определяли по голубому

декстрану и рибофлави́ну. Концентрацию элюирующихся белков и пептидов измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм (Соловьев В. Б., Генгин М. Т., 2012).

Полученную фракцию пептидов молекулярной массой свыше 5 кДа отбрасывали, а фракцию пептидов до 5 кДа использовали для изучения физиологических эффектов на лабораторных животных и анализировали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Предварительно фракцию пептидов делипидизировали с помощью раствора гексана и этилацетата. В качестве сорбента использовали силикагель. Хроматографию проводили на хроматографических системах NGC Chromatography System BIO RAD. Колонку фирменного изготовления, заполненную носителем силикагель «Vydak C-18» (250 x 3,9 мм) с размером частиц 5 мкм, уравнивали 0,1 % трифторуксусной кислотой. Затем с помощью инжектора проводили нанесение делипидизированного образца, подлежащего фракционированию в объеме 50 мкл. Наносимый образец содержал 300±50 мкг белка (концентрацию белков и пептидов определяли спектрофотометрически при 280 нм). После завершения нанесения образца осуществляли элюцию белков градиентом 50% ацетонитрила в растворе 0,1% трифторуксусной кислоты. Скорость нанесения образца на колонку 0,3 мл/мин, общее время анализа составляло 60 мин, время прохождения раствора каждой концентрации было одинаковым. Для детекции пептидного состава использовали длины волн 216, 226, 250, 280 нм. Калибровку колонки осуществляли с помощью пептидов с разными молекулярными массами – окситоцин (1 кДа), α- и β-цепи инсулина (2,5 и 3,5 кДа), а также рибофлавина (6 кДа) (Хеншен А., Хупе К.П., 1988; Арзамасцев А.П., 2011).

Для изучения физиологических эффектов, которые возникают у лабораторных животных при введении им фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа, полученных из личинок трутневого расплода, были выбраны две методики: «Выработка условного пищедобывательного рефлекса» и «Открытое поле» (Генгин М.Т. Моисеева А.А., 2013).

В качестве лабораторных животных использовались белые беспородные трехмесячные самцы крыс массой 190–220 грамм. Животных содержали в условиях вивария при искусственном освещении (СТ 12:12) со свободным доступом к воде и пище. Для выполнения экспериментов они были поделены на две группы: опытная – с интраназальным введением 20 мкл фракции пептидов за 15 минут до начала эксперимента; контрольная – с интраназальным введением 20 мкл 0,9 % NaCl за 15 минут до начала эксперимента.

Тест «Открытое поле» используется для изучения поведения животных в новых условиях окружающей среды, что само собой для них является стрессом. Данный тест служит экспериментальной моделью тревоги (Буреш, Я., 1991) и широко используется для оценки анксиолитического (уменьшающего стресс) эффекта фармакологических препаратов. Установка, используемая в тесте «Открытое поле», представляет собой круглую площадку с высокими бортами (диаметр (d) площадки для крыс – 97 см, высота бортов- 40–60 см). Площадка

разделена на 18 секторов нарисованными линиями, на них имеется 16 отверстий диаметром 2–3 см (Самотруева М. А., 2009). После введения фракции пептидов крыс помещали в центр площадки и фиксировали с помощью видеоборудования следующие параметры в течение 5 минут: горизонтальная и вертикальная двигательная активность (ГДА и ВДА), количество заходов в центральную зону, обнюхивание отверстий, наличие реакций замирания (отчаяния или «freezing»), дефекацию и груминг. С помощью этих показателей оценивается уровень стресса, которое испытывает животное в новых условиях.

Для изучения ноотропного эффекта (стимуляция умственных процессов) фракции пептидов из личинок трутней использовался тест «Выработка условного пищедобывательного рефлекса». Установка для данного теста представляет собой Т-образный лабиринт, в одном из рукавов которого находился корм (кусочки хлеба массой 0,2 грамма). Лабораторных крыс с пищевой депривацией помещали в стартовый отсек, после чего через 30–60 секунд открывали дверцу из стартового отсека в лабиринт, при этом раздавался звуковой сигнал, который служил условным раздражителем. В качестве критериев выработки рефлекса выбирали восемь правильных пробежек из десяти предъявляемых. В данном тесте регистрировали время пробежки животного от стартового отсека до кормушки и число правильных и неправильных ответов- заходы в пустой рукав (Deacon, R. M. J., 2006; Самотруева М. А., 2009). Эксперименты проводили в течение 5 дней, за данный промежуток времени у крыс на звуковой раздражитель вырабатывался пищевой условный рефлекс. Перед проведением экспериментов животных адаптировали к лабиринту: за день до эксперимента их помещали в установку Т-лабиринта (Моисеева А. А., Генгин М. Т., Гришина Ж. В., 2015).

Для оценки качественного состава белков на разных стадиях развития личинок проводили электрофоретическое фракционирование растворимых белков в 7,5% полиакриламидном (ПААГ) – блоке в нативных условиях. В ячейку геля наносили 400 ± 50 мкг белка (Lowry O.H., 1951) в объеме 40 мкл. Электрофорез проводили в 0,025 М трис- глициновом буфере pH 8,3 при напряжении 120 В и силе тока 25 мА до вхождения образцов в гель и при напряжении 180 В и силе тока 50 мА после вхождения образцов в гель. В качестве лидирующего красителя использовали бромфеноловый синий. После достижения фронта красителя 4/5 пластины геля, электрофорез останавливали. Для идентификации белковых зон по завершении электрофореза гелевую пластинку помещали на 30 минут в фиксирующий раствор (125 мл изопропанола, 50 мл уксусной кислоты, 325 мл воды, 1,25 г Кумасси R-250). Отмывку геля от красителя осуществляли в течение суток смесью уксусная кислота – этанол - вода в соотношении 10-1-30 (Стручкова И.В., Кальясова Е.А., 2012).

Определение активности катепсина D и трипсиноподобной протеазы проводили в экстракте личинок. Для проведения опытов по изучению активности **катепсина D** использовали модифицированную методику. В инкубационную среду, содержащую 120 мкл 100 мМ натрий- ацетатного буфера (pH=4,5) добавляли 40 мкл 10% экстракта трутневых личинок, 40 мкл 8% гемоглобина, перемешивали и на 40 минут помещали в водяной термостат на инкубацию при

температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 5% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробы центрифугировали 20 минут при 4000 об/мин, отбирали 100 мкл супернатанта на проведение цветной реакции. Количество продуктов гидролиза гемоглобина определяли по методу Лоури (Lowry O.H., 1951). Для расчета удельной активности фермента из полученных величин оптических плотностей опытных проб вычитали величины оптических плотностей соответствующих контрольных проб, которые отличались от опытных проб тем, что ТХУ в них вносили перед добавлением субстрата (Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016).

При определении **трипсиноподобной активности** использовали метод Ансона (Anson M., 1938) с некоторыми модификациями. Реакцию начинали прибавлением 0,5 мл БАПНА к инкубационной среде, содержащей 300 мкл 0,05 М фосфатного буфера (pH=10) и 250 мкл гомогената личинок, после 30 минут инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 350 мкл 1 н. HCl. В контрольные пробы кислота вносилась перед субстратом. Количество образовавшегося п-нитроанилина определяли спектрофотометрически при длине волны 383 нм (Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016).

За единицу активности ферментов принимали такое их количество, которое катализирует высвобождение 1 мкмолья продукта реакции (п-нитроанилина для трипсиноподобного фермента и тирозина для катепсина D) за 1 мин на 1 мг белка. Количество выделившегося п-нитроанилина и тирозина определяли по калибровочной кривой

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием с программы Microsoft Office Excel 2003. Сравнение средних значений показателей проводили по t-критерию Стьюдента. Для оценки достоверности двух выборок использовали U-критерий Уилкинсона (непараметрический критерий Манна – Уитни). Исследование значимости различий средних значений в пределах одной серии параллельных измерений рассчитывали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), с использованием F-критерия, с уровнем достоверности $p < 0,05$. Для выявления взаимосвязи между изучаемыми параметрами использовали корреляционный анализ (Лакин Г.Ф., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Количественное содержание белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.

Судя по полученным данным о количественном содержании белков и пептидов в онтогенезе трутневых личинок и личинок рабочих пчел, можно отметить, что максимальное количество пептидов наблюдается в первые двое суток развития личинок.

Обнаруженный нами факт, возможно, указывает на то, что наиболее интенсивный обмен регуляторных пептидов наблюдается именно на начальных

этапах. Динамика содержания пептидов у личинок трутней и рабочих пчел, начиная с четвертых суток, несколько отличается: у трутней, начиная со вторых суток и по седьмые, количество пептидов убывает, а у личинок рабочих пчел на седьмые сутки наблюдается увеличение содержания пептидов. Этот факт может говорить об интенсификации внутриклеточных процессов, в которых принимают участие регуляторные пептиды на заключительном этапе развития личинки.

Результаты исследования количественного содержания белка в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития показаны на рисунке 3.

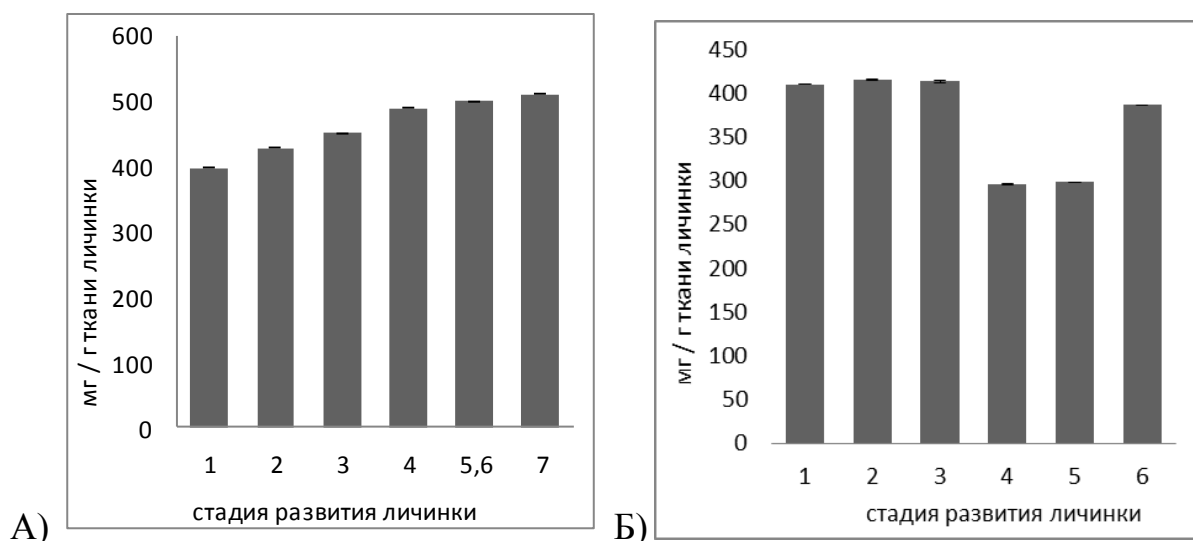


Рисунок 1. Содержание белка в мг в 1 г личинок разных возрастов.

А) Трутневый расплод. Б) Рабочие пчелы. ($M \pm m$, $n=6$), $p < 0,05$.

Из рисунка 1 видно, что у личинок рабочей пчелы, динамика содержания белков отличается от таковой у личинок трутней. Содержание белка в личинках трутней увеличивается с возрастом (рис. 1А). Содержание белков в личинках рабочих пчел имеет иной характер (рис. 1Б). В течение первых трех суток развития личинки содержание белков практически одинаково (410-415 мг), на 4-6 сутки развития личинки, наблюдается уменьшение содержания белков (296-298 мг/г личинки), а к заключительной стадии развития - резкое увеличение до 386 мг/г личинки. Полученные данные свидетельствуют о различном уровне экспрессии белков на стадии кормления тех и иных личинок маточным молочком (1-3 суток). Так, личинка рабочей пчелы, в отличие от личинки трутней, характеризуется более высокой скоростью биосинтеза белков (Hrassnigg N., Crailsheim K., 2005).

В дальнейшем, на четвертые и последующие сутки (время начала основного морфогенеза), картина меняется в противоположную сторону. Биосинтез белков начинает превалировать у личинок трутней. Подобное различие в изменении содержания белков в онтогенезе трутней и рабочих пчел является следствием того факта, что у трутней начинается морфогенез раньше, чем у рабочих пчел, и синтезируется больше белков цитоскелета, которые обеспечивают формирование больших размеров тела трутней (Fang Y, Feng M, 2015).

Результаты исследований по содержанию пептидов в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития представлены на рисунке 2. Измерения содержания белка выполнялись в каждой возрастной группе личинок в 5 технических повторах.

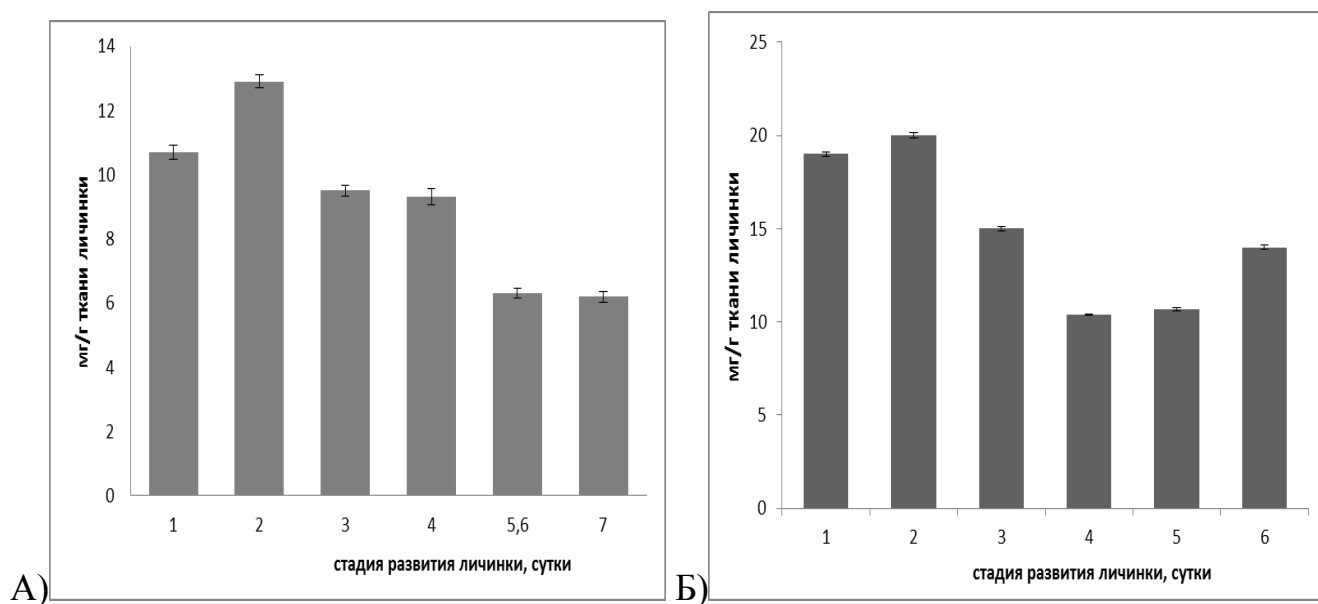


Рисунок 2. Содержание пептидов в мг на 1 г ткани личинок разных возрастов. А) Личинки трутневого расплода. Б) Личинки расплода рабочих пчел. ($M \pm m$, $n=5$). $p < 0,05$.

Количественное содержание пептидов по мере развития личинок уменьшается (рис. 2). Наибольшее содержание пептидов обнаружено на 1-3 сутки развития личинок, на данном этапе личинки вскармливаются маточным молочком. Данный вид корма личинок в первые трое суток богат аминокислотами и пептидами (Šimúth J., Bíliková K., 2001).

В личинках трутней, начиная с четвертых суток, с увеличением возраста наблюдается уменьшение содержания пептидов (рис. 2А), а в личинках рабочих пчел на заключительном этапе развития (6 сутки), напротив, наблюдается небольшое увеличение содержания пептидов (рис. 2Б). Обнаруженная закономерность может объясняться генетическими особенностями рабочих пчел: на заключительном этапе личиночной стадии происходит активизация синтеза белков углеводного обмена и белков-антиоксидантов, а также инсулин-подобных пептидов, играющих важную роль в процессах усиленного апоптоза яйцевых трубок (Jianke Li et al., 2010; Kate E. Ihle et al., 2015).

2. Разнообразие белков в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.

В нашей работе методом электрофореза в нативных условиях показана динамика белков в ходе развития у личинок трутней и рабочих пчел. Обнаружено различие в распределении белков по зонам на начальных этапах онтогенеза личинок трутней и рабочих пчел (Рис. 3).

У односуточных личинок трутней идентифицировано всего 4 белковые зоны (первый трек на рис. 3А), в то время как у личинок рабочих пчел того же возраста идентифицировано 9 белковых зон (первый трек на рис. 3Б). Такое различие в количестве белковых зон, а, следовательно, в разнообразии белков может быть следствием двух разных путей развития трутней и рабочих пчел: из неоплодотворённых и оплодотворенных яйцеклеток.

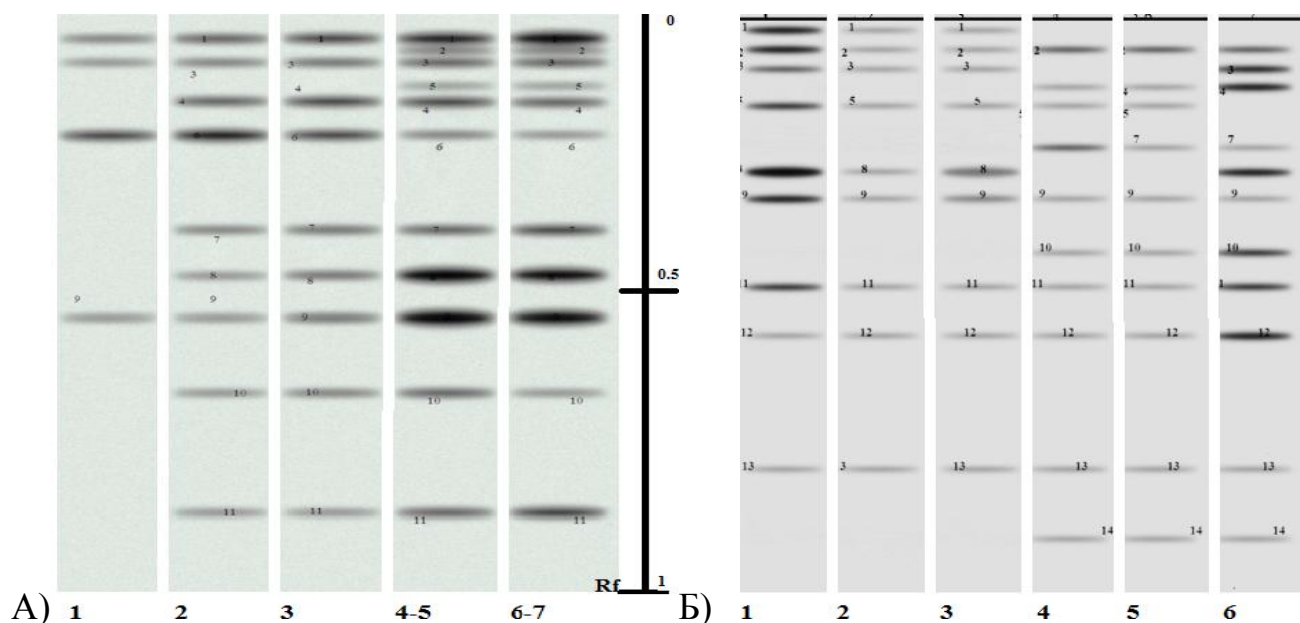


Рисунок 3. Электрофоретическое разделение водорастворимых белков А) Личинки трутней 1,2,3,4-5,6-7 суточного возраста. Б) Личинки рабочих пчел 1,2,3,4, 5,6- суточного возраста.

Картина распределения белков по зонам на более поздних этапах развития личинок трутней и рабочих пчел приобретает схожий вид и насчитывает 11 белковых фракций (4-5, 6-7 трек на рис. 3А; 7 трек на рис. 3Б). На заключительных этапах развития личинок обеих каст их питание приобретает схожий состав, что может обуславливать экспрессию белков, участвующих в схожих внутриклеточных дифференцировках (Jianke Li et al., 2010; Kate E. Ihle et al., 2015). Увеличение разнообразия белков на поздних этапах развития личинок может быть связано с началом специализации клеточных структур, участвующих в закладке органов и тканей (Chan W.T., Foster J., 2008).

3. Исследование пептидной фракции в личинках трутней и рабочих пчел методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для получения пептидной фракции производили разделение высокомолекулярных белков и низкомолекулярных пептидов в личинках трутней (рис. 4А) и рабочих пчел (рис. 4Б) методом **гель- фильтрации на сефадексе G-25**. Методом **гель- фильтрации** были разделены белки и пептиды исходного экстракта личинок, а также белки и пептиды, полученные после денатурации и

осаждения белков в исходном 10% -ном водном экстракте с помощью кипячения. На рис. 4 показан профиль элюции двухсуточных личинок. Подобный профиль разделения белков и пептидов характерен для всех возрастов личинок.

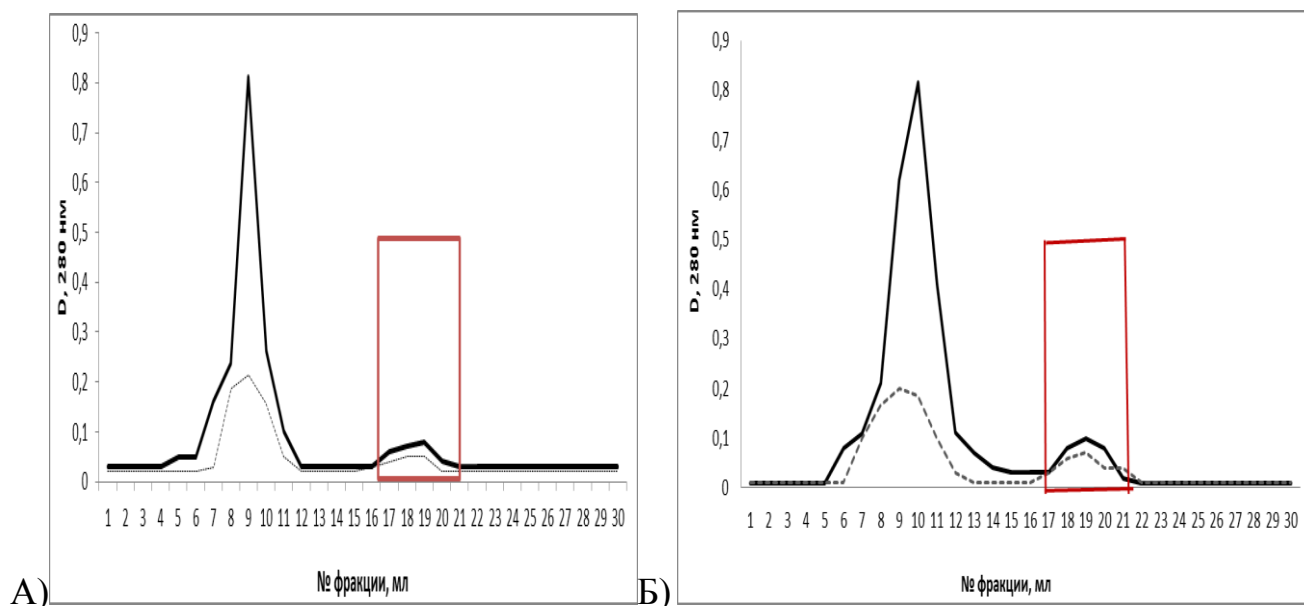


Рисунок 4. Профили элюции белка исходного 10%-ного экстракта личинок (1) и экстрактов личинок, полученных после кипячения (2). А) Личинки трутневого расплода. Б) Личинки рабочих пчел на разных стадиях развития.

При разделении белков исходного экстракта двухсуточных личинок (рис. 4) получено две основные фракции (два пика). Согласно характеристикам сефадекса G-25 (Шапиро Д.К., 1976), высокомолекулярные белки выходят в свободном объеме колонки (7-11 мл), за свободным объемом выходят низкомолекулярные белки и пептиды молекулярной массой до 5 кДа (17-21 мл). Нами было ранее показано, что, именно пептидная фракция до 5 кДа обладает выраженными физиологическими эффектами (Генгин М.Т., Моисеева А.А., 2013; Моисеева А. А., Генгин М. Т., Гришина Ж. В., 2015). В связи с этим, именно фракция пептидов до 5 кДа и послужила предметом наших дальнейших исследований.

На рисунке 4А и 4Б пунктиром изображены профили элюции экстрактов пептидов, полученных после осаждения белков кипячением. Данный прием был использован с целью получения пептидов. К тому же процесс кипячения предотвращает действие протеолитических ферментов, присутствующих в среде, и этим максимально достигается получение нативных пептидов, характерных для живого организма.

Изучение методом ВЭЖХ спектра пептидной фракции молекулярной массой до 5 кДа, которая была получена с помощью гель – фильтрации исходного экстракта после кипячения, позволило установить некоторые изменения в спектре пептидов по мере развития личинок (рис. 5).

Установлено, что с возрастом личинок увеличивается количество пептидных пиков, в то время как общее содержание пептидов уменьшается. Наибольшая концентрация пептидов наблюдается во фракциях на первые-вторые сутки развития личинок (табл. 1). Данные по количественному распределению

пептидов в хроматографических пиках после ВЭЖХ, определенные с помощью программы ChromLab, коррелируют с количественным содержанием пептидов, определяемых другими методами.

Таблица 1. Суммарная концентрация пептидов личинок трутневого расплода и рабочих пчел ($M \pm m$, $n=3$).

Суммарная концентрация пептидов в пиках (усл.ед.)						
	1-суточные	2-суточные	3-суточные	4-суточные	5-6 суточные	7-суточные
личинки трутней	5707 $\pm$ 0,02	5025 $\pm$ 0,03	2362 $\pm$ 0,05	2837 $\pm$ 0,01	441 $\pm$ 0,01	390 $\pm$ 0,03
	1-суточные	2-суточные	3-суточные	4-суточные	5-суточные	6-суточные
личинки рабочих пчел	4561 $\pm$ 0,07	4531 $\pm$ 0,05	4016 $\pm$ 0,02	521 $\pm$ 0,01	546 $\pm$ 0,01	3805 $\pm$ 0,07

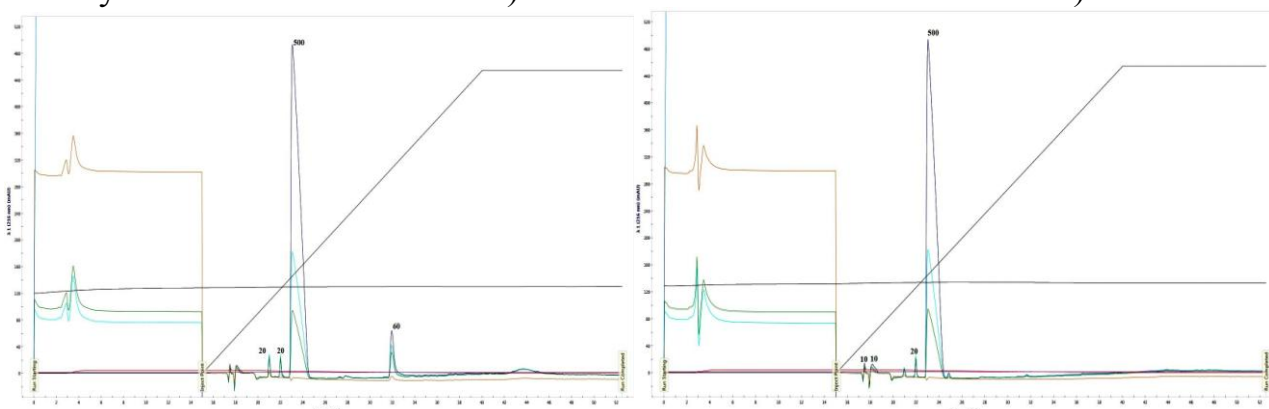
Примечание: концентрация пептидов в пиках после ВЭЖХ определена с помощью программы ChromLab.

На рисунке 5 представлены разделения пептидной фракции (до 5 кДа) личинок трутней (рис. 5А) и рабочих пчел (рис. 5Б) на разных стадиях развития. Измерение проводилось в 3 технических повторах.

1. 1-суточные личинки

А)

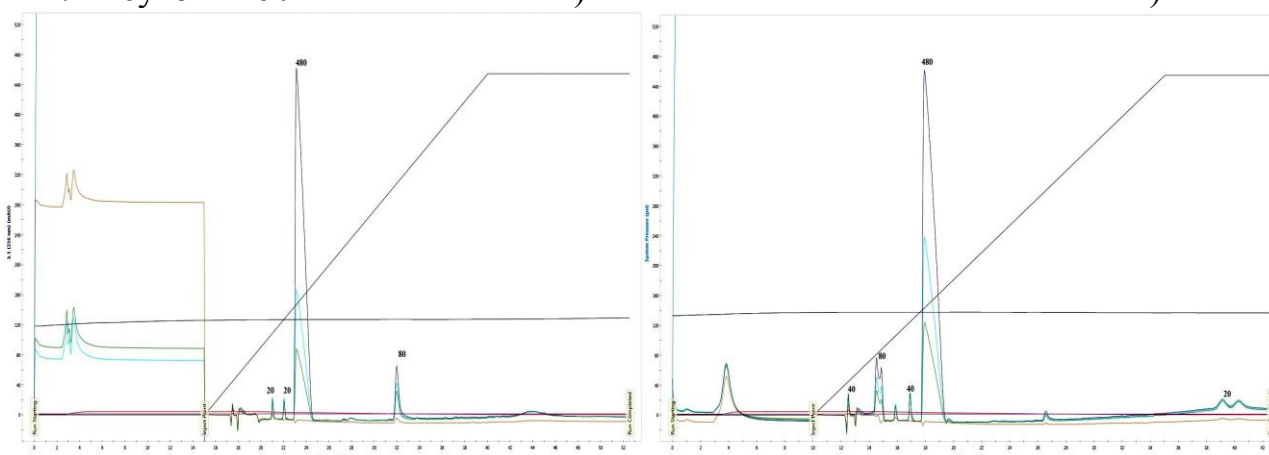
Б)



2. 2-суточные личинки

А)

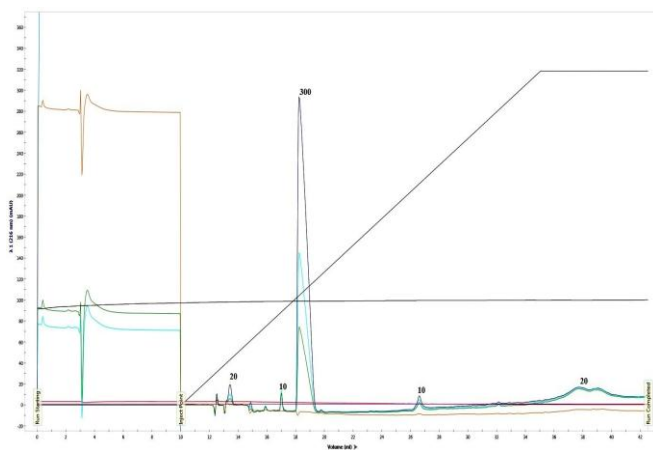
Б)



3. 3-суточные личинки

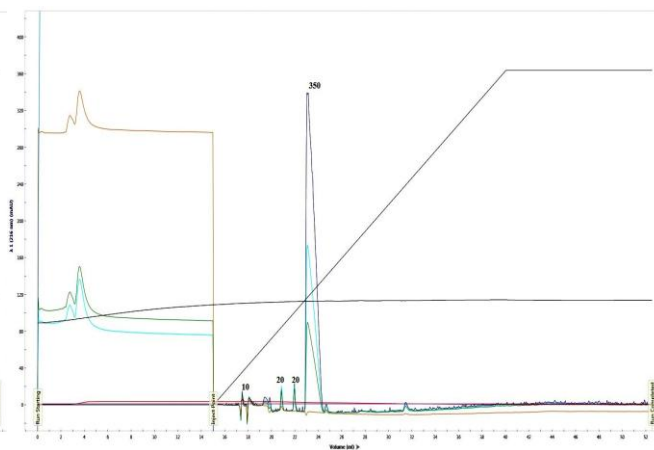
А)

Б)

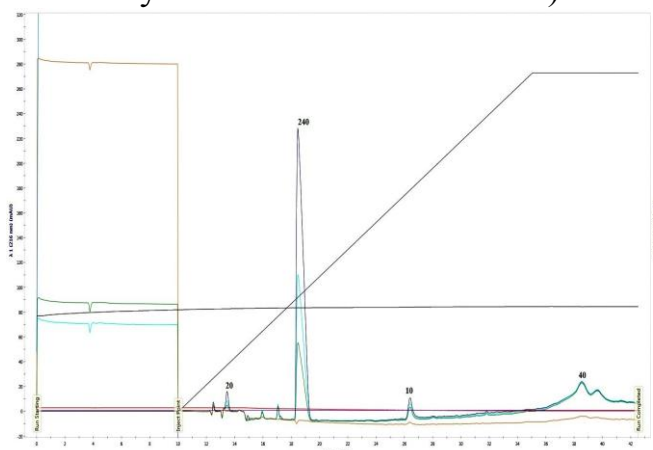


4. 4-суточные личинки

A)

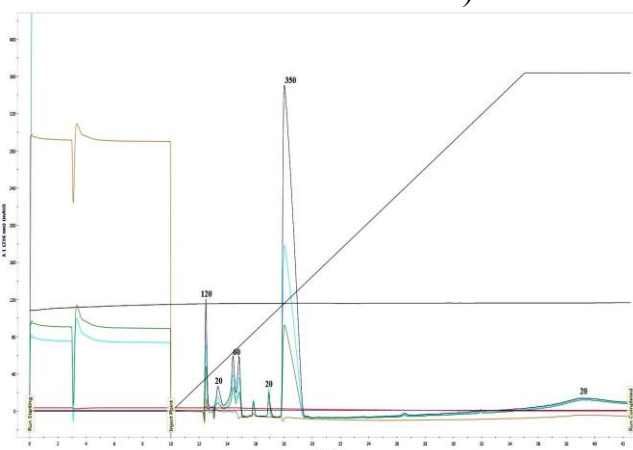


B)

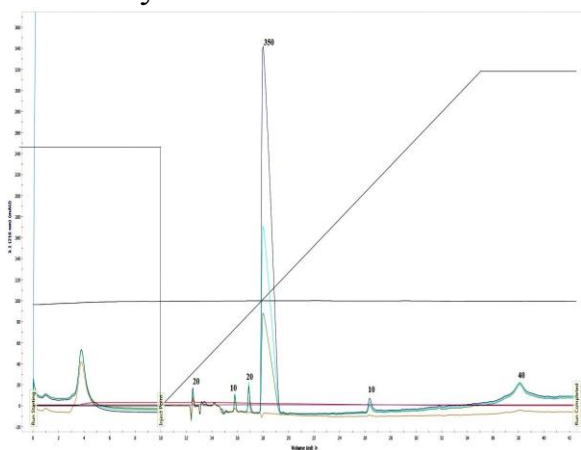


5. 5-суточные личинки

A)

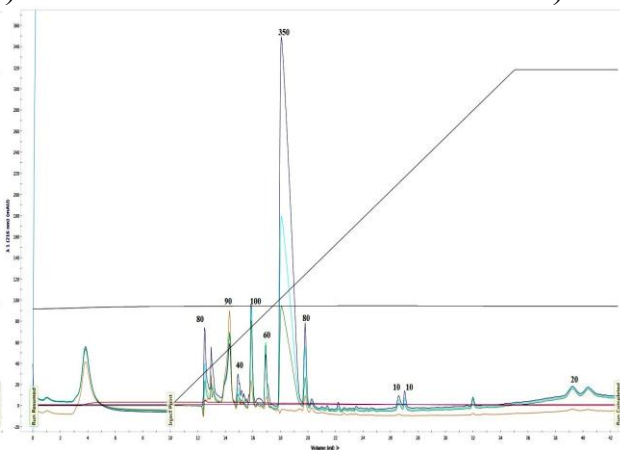


B)



6. 6- и 7-суточные личинки

A)



B)

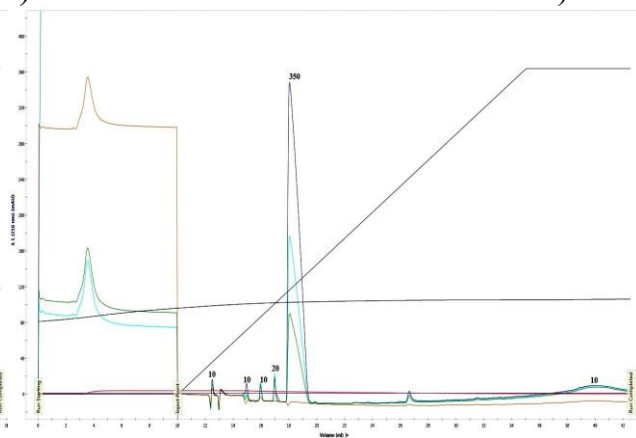
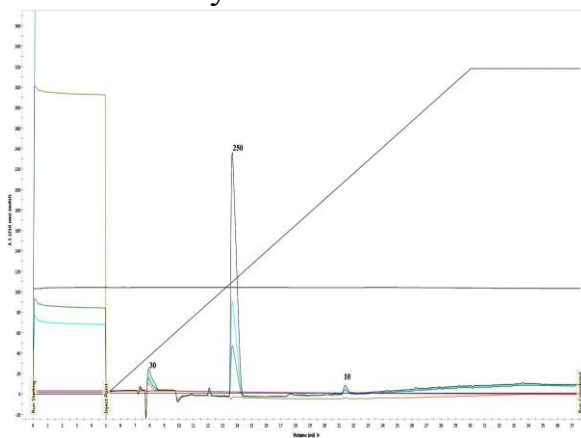


Рисунок 5. Разделение пептидов личинок разного возраста методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. А) Личинки трутней. Б) Личинки рабочих пчел. По оси ординат - экстинкция, мл; по оси абсцисс - степень поглощения при разных длинах волн: ● λ 1 (216 nm) ● λ 2 (226 nm) ● λ 3 (250 nm)

В составе низкомолекулярных пептидов (до 5 кДа) 1-суточных личинок трутневого расплода (рис. 5А) обнаружено 4 пептидные фракции с интенсивностью поглощения 500 mAU при длине волны 216 нм. У 2-суточных трутневых личинок характер распределения пептидных фракций аналогичен распределению пептидов 1-суточных личинок, но максимум интенсивности поглощения составляет 400 mAU. У 3- и 4-суточных личинок также наблюдается 4 пептидных пика, но максимум интенсивности поглощения значительно ниже, чем на начальных этапах развития личинки, и составляет 240-300 mAU. На данном этапе развития личинок трутней, на интервале экстинкции 38-44 мл появляется слабо оформленный пептидный пик с малой степенью поглощения (20-40 mAU) и широким основанием. Возможно, в состав данной фракции могут входить пептиды со схожим строением и молекулярной массой. У 5- 6-суточных личинок количество пептидных фракций возрастает до 6, максимум интенсивности поглощения составляет 350 mAU. У 7-суточных трутневых личинок наблюдается 3 пептидных пика с максимумом интенсивности поглощения 250 mAU.

Низкомолекулярные пептиды личинок рабочих пчел всех исследованных возрастов в диапазоне молекулярной массы до 5 кДа разделялись от 4 до 10 фракций (рис. 5 Б). В составе низкомолекулярных пептидов личинок 1-суточного возраста обнаружено 4 фракции с интенсивностью поглощения до 500 mAU. Можно отметить, что пептидный пик с интенсивностью поглощения 350-500 mAU встречается на каждом этапе развития личинки. Минимальное содержание пептидов идентифицировано у 4-суточных личинок: три пептидных пика с суммарным содержанием пептидов - 521 усл.ед. (табл. 3), что в 8,5 раз меньше, чем у 2-суточных личинок - 4561(максимальное содержание пептидов). У личинок более поздних этапов развития увеличивается число пиков пептидов (до 10 пиков).

Таким образом, изменение количественного содержания пептидов в развивающихся личинках, возможно, отражает интенсивность процессинга белков на конкретном этапе развития личинок. Так, на начальных стадиях развития обнаружено малое количество пептидных пиков с высокой концентрацией, тогда как к заключительной стадии развития наблюдается увеличение разнообразия пиков пептидов, но с меньшей концентрацией.

Судя по полученным данным о пептидном составе в личинках разного возраста, можно предположить, что на начальных этапах развития личинки происходит генез предшественников регуляторных пептидов, которые по мере развития личинок подвергаются модификациям, в том числе под действием протеолитических ферментов, что может приводить к образованию «зрелых», функционально- активных пептидов, способных регулировать перестройки

белковых молекул в клетке (Гомазков О. А., 1993; Ашмарин И. П., 2001; Генгин М. Т., 2002).

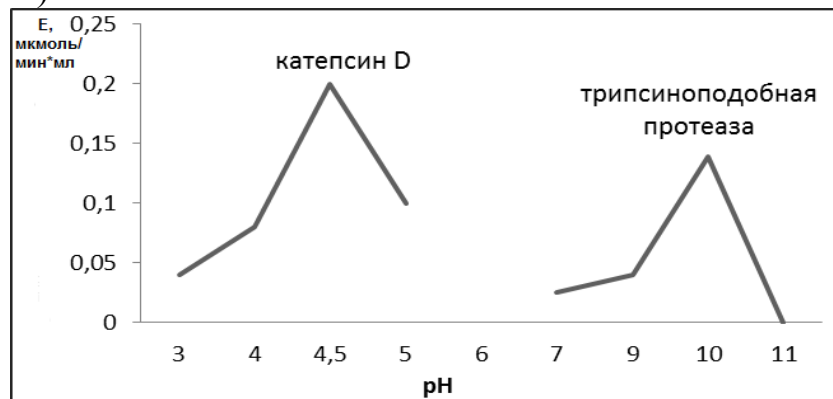
4. Активность катепсина D и трипсиноподобной протеазы в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.

Интенсификация процессов метаболизма обеспечивает высокую скорость развития личинок пчел. При этом важнейшую роль выполняет внутриклеточный протеолиз (Высоцкая Р. У., Сорокина В. В., 1995; Немова Н.Н., 2008). В связи этим, актуально изучение активности протеолитических ферментов: катепсина D и трипсиноподобной протеазы.

Большинство исследователей относят катепсин D к лизосомальным ферментам, принимающим участие в реакциях неспецифического протеолиза. Трипсиноподобные ферменты являются цитозольными ферментами. Роль этой группы фермента связывают с ограниченным протеолизом, который характерен для посттрансляционной фазы превращения белков и пептидов (Генгин М. Т., 2002; Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016).

В таблице 5 отражено изменение активности этих ферментов на разных стадиях развития личинок. Из литературных данных известно, что некоторые кинетические параметры ферментов у насекомых отличаются от таковых ферментов позвоночных животных (Cho W. L., Tsao S. M., 1999; Ярыгин Д. В., 2000). Исходя из этого, был проведен частичный **кинетический анализ** с целью подбора условий определения активности ферментов, включая подбор оптимума pH действия ферментов, концентрации субстрата, времени инкубации, а также ингибиторный анализ (рис. 6).

А)



Б.1)

Б.2)

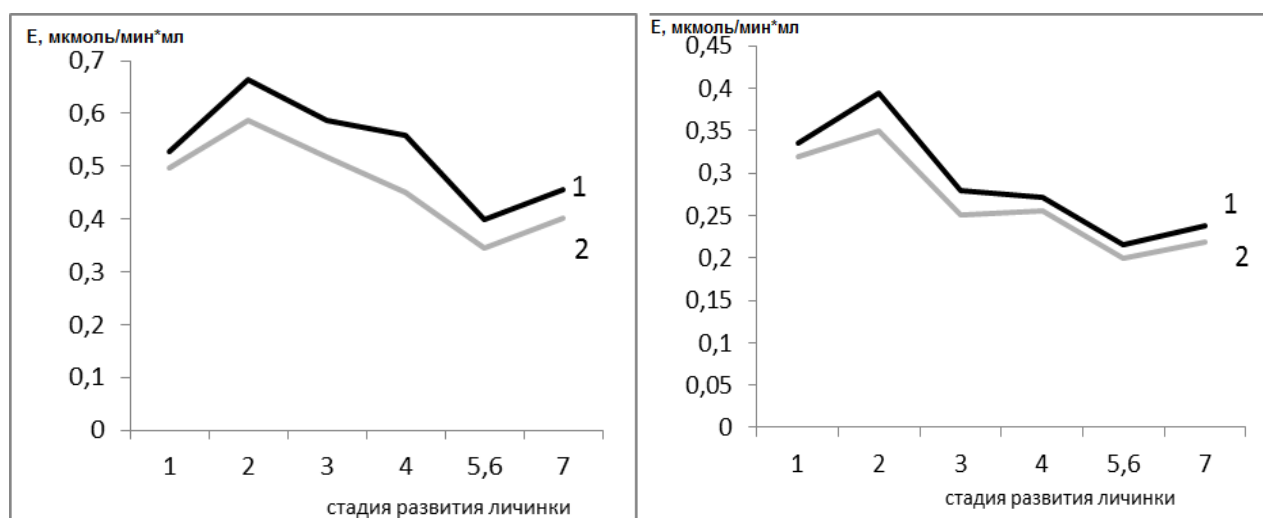


Рисунок 6. А) Зависимость активности протеолитических ферментов личинок от pH инкубационной среды. Б.1) Активность трипсиноподобной протеазы. Б.2) Активность катепсина D. 1- без ингибитора. 2- с применением специфического ингибитора. ($M \pm m$, $n=4$), $p < 0,05$.

На рисунке 6А представлены результаты определения оптимума pH исследуемых протеолитических ферментов в личинках трутней и рабочих пчел. Для определения подклассовой принадлежности протеолитических ферментов использовали ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов протеиназ (рис. 6 Б.1 и Б.2). Было установлено, что специфические ингибиторы (пепстатин для катепсина D и ингибитор Кунитца для трипсиноподобной протеазы) незначительно ингибируют активность исследуемых ферментов – не более чем на 7-10 %, т.е. являются неэффективными ингибиторами, что может свидетельствовать об ином строении активного центра данных ферментов у насекомых по сравнению с аналогичными ферментами у позвоночных животных. Сходные данные по кинетическому анализу протеолитических ферментов насекомых были получены также и другими исследователями (Иванов В. Г., 1985; Dittmer N. T., Raikhel A. S., 1997).

Таблица 2. Удельная активность (μmol/мин·мг белка) катепсина D и трипсиноподобной протеазы на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел ($M \pm m$, $n=6$), $p < 0,05$.

Стадии развития личинки, сут	1		2		3		4		5-6 (ТР), 5 (РП)		7 (ТР) 6 (РП)	
	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП
Катепсин D	2,4±0,03	1,52±0,02	2,5±0,05	1,78±0,01	4,67±0,1	1,98±0,01	3,76±0,05	1,99±0,01	3,4±0,07	2,27±0,02	2,75±0,05	1,56±0,01
Трипсиноподобная протеиназа	0,11±0,01	0,083±0,01	0,21±0,01	0,092±0,01	0,12±0,01	0,13±0,02	0,07±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01	0,094±0,01	0,04±0,003	0,11±0,01

Примечание: ТР - личинки трутней, РП-личинки рабочих пчел.

Максимальная активность **трипсиноподобной протеиназы** у личинок трутней обнаружена на 2 сутки развития, затем наблюдается снижение активности и к 5-6 суткам активность вновь увеличивается (табл.2). То есть, можно считать, что в развитии трутневых личинок наблюдается «фазность» изменения трипсиноподобной активности. У личинок трутней максимальная активность фермента обнаружена на 2-е сутки развития, к 3 – 4-ым суткам происходит уменьшение активности в 2 раза, затем, на 5-6-е сутки наблюдается увеличение активности трипсиноподобной протеазы в 2 раза, по сравнению с уровнем активности на 4-е сутки. К заключительной стадии развития активность фермента уменьшается на 70% по сравнению с максимальной активностью на 5-6-е сутки развития личинок.

Данные по изменению активности трипсиноподобной протеазы в личинках рабочих пчел приведены в таблице 4. Постепенное увеличение трипсиноподобной активности происходит с начала личиночной стадии до 4-х суток, где достигается максимум активности, затем, к 5-м суткам развития происходит снижение трипсиноподобной активности на 40% по сравнению с максимумом активности на 4-е сутки. На заключительной стадии развития личинки наблюдается небольшое увеличение активности (на 22%) по сравнению с 5-ми сутками.

У личинок трутней минимальная активность **катепсина D** обнаружена на 1-2 -е сутки развития личинок, к 3-им суткам происходит увеличение активности катепсина D в 2 раза, где наблюдается максимальная активность (табл.2). На последующих стадиях развития, наблюдается постепенное снижение его активности. Динамика активности катепсина D в онтогенезе личинок рабочих пчел (табл.2) отличается от таковой у личинок трутней. Увеличение активности катепсина D по мере развития личинки с максимумом активности на 5-е сутки. На заключительной стадии развития, наблюдается снижение активности катепсина D на 20% по сравнению с максимумом его активности на 5-е сутки.

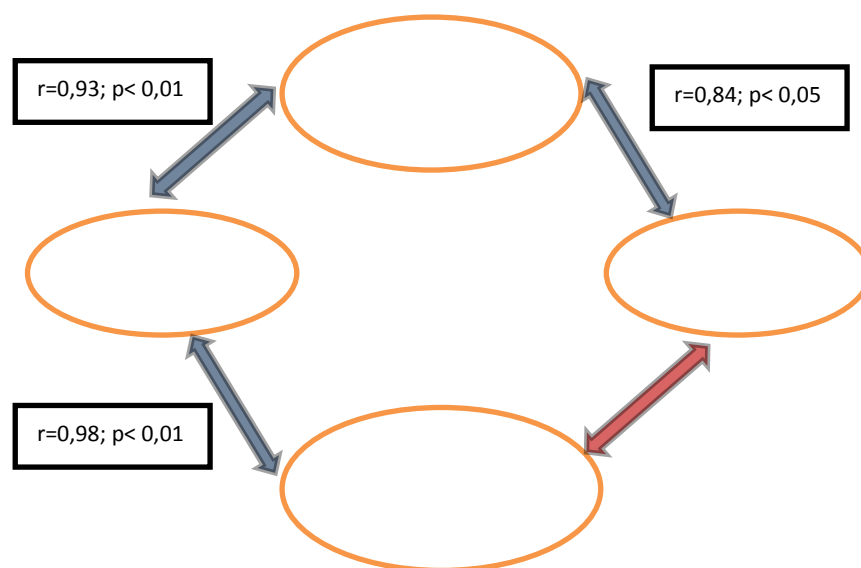


Рисунок 7. Корреляционный анализ зависимости активности ферментов и содержания белков и пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел. (Синяя стрелка - есть корреляция, красная стрелка – отсутствует корреляция).

Выявлена положительная корреляция между активностью катепсина D личинок и содержанием белков на разных стадиях развития личинок (рис. 7). Однако, в отличие от трипсиноподобных ферментов, корреляция между активностью катепсина D и содержанием пептидов на разных стадиях развития личинки не выявлена. Данное обстоятельство является ожидаемым фактом, поскольку катепсин D является лизосомальной протеиназой, принимающей участие в обмене и модификации белков, а генез регуляторных пептидов, как известно, протекает в цитоплазме (Генгин М. Т., 2002).

5. Физиологические эффекты пептидной фракции личинок трутневого расплода.

В результате исследования физиологических эффектов (анксиолитический и ноотропный) фракции пептидов с помощью теста «Открытое поле» было обнаружено, что введение пептидов крысам вызывает у них достоверное уменьшение стрессовых реакций, что выражается в увеличении двигательной (число вертикальных стоек) и ориентировочно-исследовательской активности (число заходов в центр, обнюхиваний и реакций груминга) (табл. 3). Кроме этого, у опытных крыс снижается уровень дефекации, что также говорит о снижении эмоциональной тревожности и стресса у животных.

Таблица 3. Влияние фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа личинок трутневого расплода на регистрируемые параметры в тесте «Открытое поле».

Регистрируемый параметр	Контроль	Опыт
ГДА	37±3,2	37,57±3,83*
ВДА	4,66±20,43	11,86±2,99
Заход в центр, %	16,67±2,01	57,14± 1,92 **
Обнюхивание	1,66±0,32	2,57±0,57
Реакции отчаяния	83,3 ±1,57	28,57± 1,74*
Дефекация	1,5 ± 0,38	0,43 ± 0,7**
Груминг	2,16 ± 0,05	5± 0,11**

Примечание: ГДА – горизонтальная двигательная активность, ВДА – вертикальная двигательная активность; * - достоверные отличия при $p<0,05$; ** - при $p<0,01$.

Влияние фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа на формирование условного пищедобывательного рефлекса проводилось в условиях несформировавшейся системы условных рефлексов (т.е. на ранних этапах обучения). Обнаружено, что на фоне введения пептидов у опытной группы крыс критерий осуществления правильных реакций уже на второй день эксперимента составил 91% в то время как у контрольной группы крыс - 62%. Введение пептидов также способствует сокращению латентного периода условных реакций на начальных этапах (до 4-5 секунд), по сравнению с контрольной группой животных (6-7 секунд) (табл.4).

Таблица 4. Влияние фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа личинок трутневого расплода на регистрируемые параметры в тесте «Выработка условного пищедобывательного рефлекс».

Критерий правильности условных реакций (% правильных реакций)						
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день
Контроль	43,3	62,2	76,6	88,8	91,1	96,6
Опыт	76,6	91,1**	91,25	93,75**	95	98,75
Латентный период (время пробежки, в секундах)						
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день
Контроль	11,09±1,9	9,28±2	7,88±1,26	6,77±0,9	6,14±0,88	6,08±0,62
Опыт	8,26±1,1	6,89±0,87**	6,28±1,08	5,99±1,1**	4,79±0,63	4,69±0,74

Примечание: ** - $p < 0,01$ по сравнению с контролем (по критерию Манна-Уитни).

Таким образом, показано, что введение данной фракции оказывает ноотропное действие, проявляющееся в однонаправленном усилении формирования условных пищедобывательных рефлексов у опытной группы животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современных условиях существования человека как никогда актуален поиск природных средств, обладающих выраженными физиологическими эффектами, не уступающих эффектам синтетических препаратов, которые помимо высокой стоимости имеют целый ряд побочных эффектов. Этими и многими другими причинами обусловлен повышенный интерес исследователей к выделению биологически активных веществ из природных объектов.

Представители пчелиной семьи давно находятся в центре внимания специалистов разных областей науки: биологов, биохимиков, генетиков, физиологов и тд. Она представляет собой целостную надорганизменную систему, где каждая особь запрограммированно выполняет отведенную ей функцию. Особый интерес представляет развитие пчелы на личиночной стадии, поскольку при этом представляется уникальная возможность проведения сравнительных исследований с использованием одновременно различных каст пчелиной семьи, различающихся по набору хромосом. К тому же, чрезвычайно высокая скорость процессов метаболизма на личиночной стадии требует наличия в клетке высокого содержания регуляторных веществ, одними из которых, несомненно, выступают регуляторные пептиды и протеолитические ферменты.

Исследована динамика содержания пептидов на разных этапах развития личинок, что позволит выделить личинки с максимальным содержанием пептидов для дальнейших исследований их физиологических эффектов и возможности применения в качестве природного аналога синтетических средств.

С помощью метода «Открытое поле» впервые показан анксиолитический эффект фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа, полученной из личинок трутней. Данный эффект заключался в достоверном снижении реакций стресса у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

С помощью метода «Выработка условного пищедобывательного рефлекса» впервые показан ноотропный эффект фракции пептидов личинок трутней молекулярной массой до 5 кДа. Данный эффект показан в увеличении количества правильных реакций и сокращении латентного периода условных реакций на начальных этапах эксперимента у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

Проведена сравнительная характеристика качественного и количественного состава белков, пептидов и активности протеолитических ферментов в онтогенезе у личинок трутней и рабочих пчел. Полученные данные дополняют существующие представления об особенностях механизмов онтогенеза на личиночной стадии развития насекомых.

Выявленный характер изменений в составе белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел свидетельствует об особенностях кастовой дифференцировки механизмов экспрессии белков и генеза регуляторных пептидов. Количественные данные о пептидах в личинках разного возраста послужит основанием для их выделения и изучения биологической активности, с целью их применения в фармакологии и медицине.

Впервые установлены закономерности изменения активности некоторых протеолитических ферментов, участвующих в обмене белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел. Выявлен разный характер их динамики у личинок представителей разных каст одного возраста.

Обнаружена положительная корреляция между количественным содержанием белков и активностью катепсина D, что подтверждает представление о роли данного фермента в метаболизме белков в клетке как об одном из центральных ферментов в лизосомальном пути деградации белков.

В целом, выявленный параллелизм между изменением содержания белков и пептидов и активностью изученных протеолитических ферментов на разных стадиях развития личинок может служить подтверждением существующей гипотезы о наличии в клетке полифункциональной системы регуляции, включающей в себя белки, пептиды и протеолитические ферменты (Гомазков О. А., 1993; Генгин М. Т., 2002)

ВЫВОДЫ

1. Выявлены закономерности количественного и качественного изменения пептидов и белков на разных стадиях личиночного развития трутней и рабочих пчел. Данные закономерности могут являться следствием различной интенсивности процессов метаболизма белков и генеза пептидов, вследствие генетических различий между гаплоидными и диплоидными кастами личинок, а также особенностей морфогенеза личинок и выращивания их в пчелиной семье.

2. Онтогенез пчелы медоносной на стадии личинки сопровождается положительной динамикой (увеличением) общего количества белка и обратной динамикой (уменьшением) количества пептидов. Выявленные закономерности являются следствием генетических особенностей, а также особенностей питания личинок разного возраста.

3. Установлены различия в характере изменения активности одного и того же протеолитического фермента во время развития личинок двух разных каст. Для личинок трутней максимум активности трипсиноподобной протеазы отмечен на 2-е сутки развития, для личинок рабочих пчел - на 4-е сутки. Максимум активности катепсина D у личинок трутней наблюдается на 3-и сутки развития, в то время как у рабочих пчел на 5-е сутки. Данные различия могут быть обусловлены как генетическими особенностями, так и разной продолжительностью личиночной стадии.

4. Выявлена положительная корреляция между количественным содержанием белка и активностью катепсина D и между количественным содержанием пептидов и активностью трипсиноподобной протеазы.

5. С помощью метода «Открытое поле» показан анксиолитический эффект фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа, полученной из личинок трутней. Данный эффект заключался в достоверном снижении реакций стресса у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

6. С помощью метода «Выработка условного пищедобывательного рефлекса» впервые показан ноотропный эффект фракции пептидов личинок трутней молекулярной массой до 5 кДа. Данный эффект показан в увеличении количества правильных реакций и сокращении латентного периода условных реакций на начальных этапах эксперимента у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

Практические предложения к применению результатов исследования.

Результаты данного исследования позволят отбирать личинок с максимальным содержанием регуляторных пептидов, обладающих анксиолитическим и ноотропным эффектами, для дальнейшего их выделения и идентификации, с целью создания препаратов на их основе. Данные препараты могут стать природной альтернативой синтетическим средствам, используемых в фармакологии, спорте и сельском хозяйстве в ноотропной терапии для снижения стрессовых реакций и улучшения мозговой деятельности.

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Моисеева А. А., Генгин М. Т., Гришина Ж. В., 2015. Нейростимулирующие свойства препарата пептидов, выделенных из личинок трутневого расплода // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион Естественные науки. г. Пенза. №4 (12). с. 4-10.
2. Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016. Электрофоретическое исследование белков и активности катепсина D в личинках трутневого расплода на разных стадиях их развития // Пчеловодство. №5. с. 23-25.

3. Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016. Активность протеолитических ферментов у личинок трутней разного возраста // Пчеловодство. № 2. с. 25-27.
4. Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016. Исследование белков и пептидов в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион Естественные науки. г. Пенза. №3(15). с.61-67.
5. Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016. Качественный и количественный состав пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел // Международный научно- исследовательский журнал «Успехи современной науки». г. Белгород. №11. Т.5.с.135-140
6. Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016. Исследование активности и физико-химических свойств катепсина D трутневого расплода разного возраста // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион Естественные науки. г. Пенза. №4(16). с.14-22.

Публикации в других изданиях

1. Волосникова Ж.А., Гришина Ж.В., Соловьев В.Б., 2012. Выделение и изучение свойств ферментов новой карбоксипептидазы процессинга нейропептидов // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пущинская школа – конференция молодых ученых, Пущино, Сборник тезисов, с.489.
2. Бегутов М. М., Гришина Ж.В., Игнатьев С. А., Соловьев В.Б., 2012. Изучение белкового состава продуктов пчеловодства (trutневого расплода, маточного молочка, пыльцы и перги) // «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине»: III международная научно-практическая конференция, Казань, Сборник тезисов, с. 416-417.
3. Моисеева А.А., Генгин М.Т., Гришина Ж.В., 2015. Влияние пептидов личинок трутневого расплода на активность карбоксипептидазы Н // «Advances in Science and Technology»: II Международная научно-практическая телеконференция, с. 7-9.
4. Генгин М. Т., Гришина Ж. В., Кудряшкина Л. В., 2015. Исследование активности протеолитических ферментов в личинках трутневого расплода на разных стадиях их развития // «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии»: III международная научная конференция, Днепропетровск, Украина, с. 162-163.

Список сокращений:

ПААГ- полиакриламидный гель

ТХУ- трихлоруксусная кислота

БАПНА- Натрий-бензоил-DL-аргинин-4(п)-нитроанилид

ВЭЖХ- высокоэффективная жидкостная хроматография