

## УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО «Курский  
государственный медицинский  
университет» Министерства  
здравоохранения Российской  
Федерации

д.м.н., профессор



Лазаренко В. А.

05 2024 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Клыченкова Сергея Викторовича на тему «Биологическая активность низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия

### Актуальность исследования

Биохимическая регуляция процессов, протекающих в живых организмах, сложна и разнообразна. Одним из ключевых компонентов регуляторных систем являются пептиды — короткие белковые молекулы, обладающие широким спектром биологических эффектов. К настоящему времени достигнут значительный прогресс в изучении механизмов действия пептидов на различные физиологические и биохимические процессы, в особенности в области биохимии мозга. На основании данных многочисленных исследований была сформулирована и получила широкое распространение теория функционального континуума регуляторных пептидов, в соответствии с которой пептидергическая система

является как связующим звеном между другими классическими нейромедиаторными системами нервной ткани, так и важным отдельным механизмом регуляции функций организма, в том числе и целого ряда важных биохимических процессов.

Более глубокому пониманию механизмов работы регуляторных систем способствует изучение биологически активных молекул, способных изменять характер работы той или иной системы. Поэтому достаточно актуальным является изучение биологической активности низкомолекулярных пептидов, выделенных из различных природных источников. Одним из перспективных источников подобных пептидов в настоящее время стали продукты пчеловодства: маточное молочко, трутневый расплод, пчелиный мёд. Экспериментально доказано, что продукты пчеловодства обладают широким спектром биологической активности: антибактериальной, противовоспалительной, антиоксидантной, ранозаживляющей, противоопухолевой, иммуномодулирующей, ноотропной, способностью влиять на поведение экспериментальных животных и т. д., однако механизмы, задействованные в реализации того или иного эффекта, во многих случаях остаются неизученными. При этом наличие в составе продуктов пчеловодства низкомолекулярных пептидов (массой менее 5 кДа), а также их вовлечённость в регуляцию различных физиологических и биохимических процессов позволяет рассматривать их как основу биологической активности нативных продуктов пчеловодства.

В диссертационном исследовании Клыченкова С. В. проведена экспериментальная работа по изучению биологической активности низкомолекулярных пептидов из трутневого расплода, маточного молочка и пчелиного мёда: способности влиять на процессы жизнедеятельности различных штаммов микроорганизмов и поведение лабораторных животных в условиях хронического стресса. Представленная диссертационная работа является актуальным исследованием, направленным на изучение биологической активности пептидов массой до 5 кДа из продуктов пчеловодства и выяснение биохимических механизмов, на которые оказывают влияние данные молекулы.

## Научная новизна исследования

С целью изучения биологической активности низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства был разработан гибкий, масштабируемый и автоматизируемый способ выделения низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства. Впервые качественно охарактеризован спектр низкомолекулярных пептидов маточного молочка, пчелиного мёда и трутневого расплода. Впервые показана способность пептидов с массой до 5 кДа, выделенных из маточного молочка и трутневого расплода, влиять на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса, снижая уровень тревожности. Впервые показана способность низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства влиять на активность карбоксипептидазы E (КФ 3.4.17.10) и пептидилдипептидазы A (КФ 3.4.15.1) в различных отделах головного мозга крыс Wistar. Впервые показано, что низкомолекулярные пептиды маточного молочка и трутневого расплода влияют на общую дегидрогеназную и каталазную активность *E. coli* и *S. aureus*. Установлено, что антибактериальный эффект продуктов пчеловодства является совокупностью действия разных факторов.

## Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности результатов диссертационной работы свидетельствует достаточный объём выполненных экспериментальных исследований и полученных лабораторных данных, использование в работе широкого спектра классических методов биохимии микроорганизмов, нейрохимии, энзимологии и пептидомики, современная статистическая обработка полученных данных с использованием специализированного программного обеспечения, наличие достаточного количества использованных при анализе полученных данных отечественных и зарубежных литературных источников.

Основные результаты диссертационного исследования были опубликованы в 14 печатных работах, 4 из которых — статьи в журналах списка ВАК РФ.

Материалы исследования также доложены на 6 конференциях международного и всероссийского уровня.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Теоретическая значимость исследования состоит в детальном изучении биологической активности низкомолекулярных пептидов (массой до 5 кДа) из продуктов пчеловодства: маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда; в установлении зависимости между анксиолитическим действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода и активностью ферментов обмена регуляторных пептидов — карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A. Практическая значимость исследования состоит в том, что разработанный метод выделения и очистки исследуемых пептидов пригоден для выделения подобных молекул из другого биологического сырья, обладающего схожими химико-физическими характеристиками: многокомпонентностью состава и большим количеством низкомолекулярных примесей.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение и список цитируемой литературы, который содержит 408 источников, в том числе 47 на русском и 361 на английском языках. Работа изложена на 150 листах, иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами.

В первой главе представлен обзор литературы с изложением основных данных о компонентной характеристике пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода, в котором сделан особый акцент на их белково-пептидный состав. В подглаве 1.2 автор анализирует данные о наличии антибактериального эффекта и способности влиять на поведение экспериментальных животных перчисленных продуктов пчеловодства. В подглаве 1.3 приведены данные о нейробиологических основах развития тревожности как с учётом характера

функционирования классических нейромедиаторных систем, так и пептидергической.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования. Методическая часть диссертационного исследования соответствует поставленным целям. Выделение и очистка низкомолекулярных пептидов (массой менее 5 кДа) из маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда выполнялась с использованием методов ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Для изучения спектра выделенных пептидов были использованы высокоэффективная жидкостная хроматография, для оценки молекулярной массы — гель-электрофорез в денатурирующих условиях. Для оценки способности выделенных пептидов влиять на процессы жизнедеятельности микроорганизмов (штаммы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae*) была изучена их антибактериальная активность диско-диффузионным методом и методом оценки минимальной ингибирующей концентрации, а также была изучена способность пептидов влиять на общую дегидрогеназную и каталазную активность *S. aureus* и *E. coli*. Оценку способности выделенных пептидов влиять на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса проводили с использованием самцов крыс Wistar. Экспериментальный стресс моделировали с применением общепринятой методики хронического случайного умеренного стресса, а пептиды вводили в течение 15 дней интраназально в концентрации 300 мкг/кг массы тела. Изменения в поведении оценивали с помощью ряда общепринятых тестов («Открытое поле», «Вынужденное плавание», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Тёмная/светлая комната», «Предпочтение сахарозы»). Биохимический ответ на стресс и введение пептидов оценивали по изменению концентрации гормонов стресса (кортикостерон и адренкортикотропин измеряли методом ИФА в сыворотке крови) и ферментативной активности карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A в нервной ткани (гипофиз, гипоталамус, стриатум, гиппокамп, миндалина, четверохолмие, продолговатый мозг) и надпочечниках

или сыворотке крови (КПЕ и ПДПА соответственно). Полученные экспериментальные данные были корректно статистически обработаны.

В главе 3 автор представил результаты собственных исследований, а в главе 4 проводит их детальный анализ. В результате исследования было установлено, что пептидный состав продуктов пчеловодства отличается значительным разнообразием. Методами гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии было установлено присутствие как минимум 9 пептидов в маточном молочке, 11 - в трутневом расплоде и 10- в пчелином мёде, часть из них имеет в своём составе ароматические аминокислоты.

При изучении антибактериального действия выделенных пептидов было показано, что с повышением степени очистки совокупности низкомолекулярных пептидов снижается также и антибактериальная активность исследованных растворов от сомнительной до её полного отсутствия. Изучение влияния полученных пептидов продуктов пчеловодства на ферментативную активность *S. aureus* и *E. coli* показывает, что даже при отсутствии антибактериального эффекта пептиды оказывают влияние на метаболизм бактерий, увеличивая активность дегидрогеназ и каталаз. Повышение активности данных ферментов свидетельствует о напряжении метаболических процессов в бактериальной клетке, вызванном пептидами маточного молочка и трутневого расплода.

Анализ совокупности полученных результатов поведенческих тестов позволяет полагать, что в условиях хронического стресса длительное (более 15 суток) интраназальное введение очищенных пептидов маточного молочка и трутневого расплода в концентрации 300 мкг/кг массы тела снижает выраженность тревожного поведения самцов Wistar. В тестах «Открытое поле», «Вынужденное плавание», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Тёмная/светлая комната», «Предпочтение сахарозы» у животных под действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода по сравнению с контролем уменьшалось количество поведенческих реакций, ассоциированных с тревожностью.

В экспериментах по изучению влияния интраназального введения низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства было установлено, что актив-

ность карбоксипептидазы Е под действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода снижается в гипофизе, амигдале и продолговатом мозге, но повышается в четверохолмии, стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе, в то время как активность пептидил-дипептидазы А была снижена в гипоталамусе, гипофизе, стриатуме, амигдале, четверохолмии и продолговатом мозге. В то же время активность обоих ферментов не изменялась в надпочечниках и сыворотке крови. Данные факты свидетельствуют о том, что при интраназальном введении исследованные пептиды действовали только в различных отделах головного мозга и не проникали в системный кровоток. Не было найдено прямого влияния пептидов маточного молочка и трутневого расплода на активность обоих ферментов *in vitro*. Полученные результаты показывают несомненную способность низкомолекулярных пептидов из маточного молочка и трутневого расплода влиять на биохимические процессы в мозге, однако отсутствие влияния выделенных пептидов на ферментативную активность КПЕ и ПДПА в условиях *in vitro* может свидетельствовать о том, что низкомолекулярные пептиды маточного молочка и трутневого расплода действуют через пока ещё не установленные клеточные мишени, что приводит к изменению функционирования пептидергических механизмов через регуляцию активности ферментов процессинга нейропептидов.

Автореферат диссертации Клыченкова С.В. в полной мере соответствует основным положениям диссертации и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями. В нем подробно описаны методология и методы исследования, передано основное содержание работы в виде результатов исследования. Выводы, приведенные в автореферате, соответствуют изложенным в диссертации.

Принципиальных замечаний по рассматриваемой диссертационной работе нет, однако возникли следующие вопросы.

1. Насколько стабильны во времени исследованные пептиды?
2. Какой критерий был использован для подтверждения гипотезы о равенстве дисперсий?

3. В процессе статистической обработки полученных данных были использованы какие-либо поправки к использованным критериям?

4. Известно, что при интраназальном введении у крыс значительная часть раствора может теряться вследствие чихания. Какая методика данного способа введения была использована в работе?

5. Каким образом пептиды при интраназальном введении могли проникать в головной мозг?

### **Рекомендации о практическом применении результатов диссертационного исследования**

Пептиды маточного молочка и трутневого расплода массой до 5 кДа перспективны для разработки биопрепарата, обладающего анксиолитическим эффектом, а разработанный способ их выделения возможно применить для выделения пептидов из другого природного сырья.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Клыченкова Сергея Викторовича на тему «Биологическая активность низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является завершённым научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном и методологическом уровне. В работе содержится решение актуальной научной задачи - изучение влияния пептидов из маточного молочка, пчелиного мёда и трутневого расплода на процессы жизнедеятельности микроорганизмов и физиолого-биохимический ответ экспериментальных животных на хронический стресс.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, а также объёму и уровню проведённого исследования диссертация полностью соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» от 29.09.2013 г., №842 (с изменениями от 18.03.2023 г., №415), утверждённого Постановлением Правительства



ства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени, а её автор Клыченков Сергей Викторович заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Отзыв обсуждён и одобрен на заседании кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, протокол № 10 от 29 апреля 2024 года.

Заведующий кафедрой патофизиологии  
федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Курский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук, профессор



Бобынцев Игорь Иванович

Подпись профессора И.И. Бобынцева удостоверяю:

Начальник управления кадров федерального  
государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Курский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации



И.И. Сорокина

«15» 05 2024 г.

305041, Российская Федерация, Курская область, г. Курск, ул. Карла Маркса, д.  
3, тел. +7(4712) 58-81-32, e-mail kurskmed@mail.ru, <https://kurskmed.com/>