

На правах рукописи



КЛЫЧЕНКОВ СЕРГЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ
ИЗ ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА**

1.5.4 — Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Пенза — 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пензенский государственный университет».

Научный руководитель: **Кручинина Анастасия Дмитриевна**,
кандидат биологических наук, доцент кафедры «Общая биология и биохимия» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пензенский государственный университет»

Официальные оппоненты: **Менджеричкий Александр Маркович**,
доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры коррекционной педагогики Академии психологии и педагогики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

Салтыкова Елена Станиславовна,
доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии адаптивности насекомых Института биохимии и генетики — обособленного структурного подразделения федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «17» июня 2024 года в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.241.02 при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14 и на сайте организации <https://ion.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Шумакова А. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Установлено, что пептиды играют важнейшую роль в регуляции физиологических процессов. Пептидная регуляция сложна и находится в равновесии с работой других регуляторных систем. Большое разнообразие пептидов, которых известно более 800 (NeuroPedia: Neuropeptide database and spectra library. URL: <http://proteomics.ucsd.edu/Software/NeuroPedia/>), а также широкий спектр их физиологических эффектов позволили сформулировать теорию функционального континуума (Ашмарин, 1996). Кроме того, изменения в пептидергической регуляторной системе также сказываются и на работе систем классических нейромедиаторов и нейротрансмиттеров.

На характер работы пептидергической системы влияют как эндогенные, так и экзогенные биологически активные молекулы. Большое значение не только с точки зрения фундаментальной науки, но и для практического применения имеют исследования по изучению биологических эффектов экзогенных низкомолекулярных пептидов. Особенно актуальным является поиск пептидов с различной биологической активностью, содержащихся в продуктах природного происхождения, в том числе маточном молочке, трутневом расплоде и пчелином мёде. Известно, что они обладают разнообразной биологической активностью (Ишмуратова, 2007; Chen, 2017; Erejuwa, 2012; Fadzil, 2023; Israili, 2014; Khazaei, 2017), основы проявления которой изучены мало. Эффекты продуктов пчеловодства связывают с влиянием отдельных компонентов на биологические системы. Например, установлена связь между антиоксидантным эффектом пчелиного мёда и фенольными соединениями растительного происхождения в его составе (Erejuwa, 2012). Относительно недавно стало известно, что в составе маточного молочка и пчелиного мёда, так же как и в трутневом расплоде, содержатся биологически активные пептиды. Между тем, активность этих пептидов изучена недостаточно.

Среди прочих эффектов, пчелиный мёд, маточное молочко и трутневый расплод оказывают антибактериальное действие на различные культуры микроорганизмов (Brudzynski, 2021; Rutka, 2021; Sawczuk, 2019). Одной из причин антагонистической активности продуктов пчеловодства по отношению к микроорганизмам могут быть антимикробные пептиды, имеющиеся в их составе. Изучение антибактериального действия таких пептидов является особенно важной задачей в связи с ростом количества случаев антибиотикорезистентности бактерий. Развитие устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам связывают с широким применением антибиотиков в сельском хозяйстве, их нерациональным использованием в медицинской практике (MacGowan, 2017), с пандемией COVID-19 (Lai, 2021). Антимикробные пептиды активно исследуются по всему миру как возможная замена существующим антибиотикам.

Единичные сообщения также свидетельствуют о способности растворов трутневого расплода, маточного молочка и пчелиного мёда влиять на поведение экспериментальных животных (Патент РФ Патент № 2609872; Azman, 2019; Chen, 2017; Ryzanowska, 2014), однако данные фрагментарны, и исследования в данной области нуждаются в системном подходе. Возможно, причиной наблюдаемых изменений в поведе-

нии животных является способность пептидов, имеющих в составе продуктов пчеловодства, влиять на характер работы различных нейромедиаторных систем нервной ткани, в том числе пептидергической. За последние десять лет в подтверждение данной гипотезы было найдено, что под действием интраназального введения пептидов продуктов пчеловодства изменяется также и активность разнообразных ферментов нервной ткани крыс (Григорьева, 2015; Кротова, 2015; Моисеева, 2015; Моисеева, 2015). Ферменты обмена регуляторных нейропептидов (карбоксипептидаза E, пептидил-дипептидаза A и др.) участвуют в процессинге множества нейроактивных пептидов, регулируя их уровень на стадии созревания ограниченным протеолизом, поэтому изменение в уровне активности данных ферментов отражает функциональную нагрузку на пептидергическую систему различных регионов мозга (Ашмарин, 1996).

Несмотря на недостаточную изученность нейрохимических процессов, лежащих в основе развития тревожности, накопленные литературные данные свидетельствуют о комплексности регуляции данного типа поведения, в которой принимают участие также и пептидергическая система. Изучение способности низкомолекулярных пептидов маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда влиять на поведение в контролируемых условиях путём создания хронического стресса у экспериментальных животных методически послужит более прочной основой для дальнейших исследований не только биологической активности пептидов продуктов пчеловодства, но и биохимической регуляции поведения в целом.

Таким образом, изучение способности низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства влиять на процессы жизнедеятельности микроорганизмов и их способность влиять на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса является актуальной темой исследования.

Степень разработанности темы исследования. Биологические эффекты продуктов пчеловодства изучены недостаточно. Известно об антибактериальных, антиоксидантных, противовоспалительных, противораковых и других свойствах продуктов пчеловодства, которые связаны с компонентами растительного или пчелиного происхождения в их составе. Имеются сведения о ноотропном, анксиолитическом (противотревожном) и антидепрессивном эффектах пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода (Митрофанов, 2021; Моисеева, 2015; Azman, 2015; Azman, 2019; Othman, 2015; Ryzanowska, 2014). Они могут быть связаны с биологической активностью пептидов, обнаруженных в составе пчелопродуктов. Недостаточная степень изученности низкомолекулярных пептидов из пчелиного мёда, маточного и трутневого расплода не позволяет достоверно судить о механизмах проявления того или иного эффекта.

В связи с этим **целью данной работы** было изучение биологической активности пептидов массой до 5 кДа, выделенных из маточного молочка, пчелиного мёда и трутневого расплода, в аспекте влияния на процессы жизнедеятельности микроорганизмов и физиолого-биохимический ответ экспериментальных животных на хронический стресс.

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

1. Изучить пептидный спектр продуктов пчеловодства методом высокоэффек-

тивной жидкостной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле.

2. Разработать способ выделения и очистки пептидов массой до 5 кДа из продуктов пчеловодства.

3. Изучить способность выделенных пептидов влиять на поведение самцов крыс линии Wistar в условиях хронического стресса при постоянном интраназальном введении в концентрации 100 мкг/кг и 300 мкг/кг массы тела с применением ряда физиолого-фармакологических тестов.

4. Изучить способность выделенных пептидов влиять на концентрацию гормонов стресса (АКТГ и кортикостерона) в сыворотке крови и активность ферментов обмена нейропептидов (карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A) в нервной ткани, сыворотке крови и надпочечниках экспериментальных животных в условиях хронического стресса.

5. Изучить способность выделенных пептидов влиять на жизнедеятельность микроорганизмов, определив антибактериальную активность диско-диффузионным методом, их минимальную ингибирующую концентрацию и способность изменять общую дегидрогеназную и каталазную активность.

Научная новизна и практическая значимость данной работы состоит в том, что 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 пептидил-дипептидазы A (КФ 3.4.15.1) в различных отделах головного мозга крыс линии 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 разных факторов. На основе полученных данных была составлена заявка для программы Фонда содействия инновациям «УМНИК», победившая в конкурсе (договор 18646ГУ/2023 от 01.09.2023 «Разработка биологически активной добавки из пептидов маточного молочка с анксиолитическим действием»).

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования послужили труды учёных в области биохимии микроорганизмов, нейрохимии, энзимологии и пептидомики. Полученные в ходе эксперимента результаты для оценки достоверности были статистически обработаны с применением методов оценки нормальности распределения и методов параметрического и непараметрического анализа.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на всероссийских и международных научно-практических конференциях: XII Международной научно-практической конференции EurasiaScience (Москва, декабрь 2017), Всероссий-

ской (национальной) научно-практической конференции, посвящённой 90-летию со дня рождения профессора Г. Б. Гальдина «Роль вузовской науки в решении проблем АПК» (Пенза, октябрь 2018), IX Международной научно-практической конференции «Мир в эпоху глобализации экономики и правовой сферы: роль биотехнологий и цифровых технологий» (Москва, сентябрь 2021), XVIII научно-практической межрегиональной конференции «Биомедицина и биомоделирование» (Московская область, май 2022), II Всероссийской научно-практической конференции «Беккеровские чтения» (Волгоград, ноябрь 2022), Научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 90-летию со дня рождения член-корреспондента РАМН, профессора А. В. Завьялова «От молекулы к системной организации физиологических функций» (Курск, апрель 2023).

Положения, выносимые на защиту:

1. Пептиды массой до 5 кДа, выделенные из маточного молочка и трутневого расплода, при хроническом интраназальном введении (300 мкг/кг массы тела) влияют на поведение самцов крыс линии Wistar в физиолого-фармакологических тестах, уменьшая уровень поведения, ассоциированного с тревожностью.

2. Пептиды массой до 5 кДа, выделенные из маточного молочка и трутневого расплода, влияют на активность карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A в различных отделах головного мозга экспериментальных животных, но не попадают в системную циркуляцию.

3. Пептиды массой до 5 кДа, выделенные из продуктов пчеловодства, не оказывают антибактериального действия на культуры *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae*.

4. Пептиды массой до 5 кДа, выделенные из маточного молочка и трутневого расплода, влияют на общую дегидрогеназную и каталазную активность *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из которых 4 — статьи в рецензируемых журналах списка ВАК РФ.

Структура и объём диссертации: диссертация 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 наименований на русском и английском языках. Работа изложена на 150 листах, иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ «Аспиранты» (проект №20-34-90050 «Изучение анксиолитического, антидепрессивного и актопротекторного эффекта пептидных фракций пчелиного мёда, маточного молочка и их влияние на активность ферментов обмена регуляторных пептидов»).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Приводится компонентная характеристика пчелиного мёда, маточного молочка и

трутневого расплода, а также данные об их биологической активности: антибактериальном действии и способности влиять на поведение. Особое внимание уделяется белково-пептидному составу данных продуктов пчеловодства. В главе также обсуждается роль нейромедиаторных и пептидергической систем мозга в развитии тревожного поведения, приводятся данные о функциональной значимости ферментов обмена регуляторных нейропептидов — карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A. На основании литературных данных можно заключить, что пептидный состав продуктов пчеловодства изучен крайне недостаточно, равно как биологические эффекты данных пептидов, особенно в аспекте влияния на биохимию мозга.

Материалы и методы исследований

Исследование было проведено на базе лабораторий ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». Образцы пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода были получены с частных пасек Пензенской области (Пензенский («Лесная поляна»), Кузнецкий и Камешкирский районы). Порода пчёл во всех случаях — «Карника» (краинка, *Apis mellifera carnica*).

Способ выделения и очистки низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства. Для получения пептидов массой до 5 кДа из пчелиного мёда, маточного молочка и личинок трутневого расплода был разработан способ, состоящий из комбинации ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Водные растворы маточного молочка, пчелиного мёда и центрифугированный гомогенат личинок трутневого расплода (возраст 5-7 сут) были пропущены через ультрафильтрационную мембрану VivaFlow 200 с порогом отсечения 5 кДа. Пермеат был очищен от низкомолекулярных примесей ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе (однократная смена буфера, сорбирующий — 0,2 М Трис-HCl (pH=10), десорбирующий — 0,2 М Na-цитратный (pH=6)). Контроль содержания примесей вели по фруктозе (Филиппович, 1982), концентрацию белковых компонентов во фракциях определяли методом Лоури. Отсутствие фенольных и стероидных соединений определяли спектрофотометрически с FeCl₃ (Singh, 2008). Очищенные объединяли и лиофилизировали, перерастворяли в дистиллированной воде и обессоливали на сефадексе G-25. Наличие пептидов во фракциях определяли спектрофотометрически на длине волны 280 нм.

Метод оценки молекулярной массы. Молекулярная масса пептидов продуктов пчеловодства была оценена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (30% T, 2,67% C) в денатурирующих условиях (по Лэммли) с фиксацией геля раствором глутарового альдегида перед окрашиванием (концентрация разделяющего геля — 20%, концентрирующего — 7%). В качестве стандарта молекулярных масс был использован набор маркеров с ультра низким диапазоном масс (1,060-26,600 Да). Обработка результатов была проведена с применением ПО ImageJ с набором макросов MolWt.

Методы изучения пептидного спектра продуктов пчеловодства. Разнообразие пептидов в очищенных фракциях изучали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Использовали хроматографическую систему NGC Quest 10 Plus, колонка SUPELCOSIL LC-18-T размером

250×4,6 мм (частицы 5 мкм). Перед анализом пробы делипидизировали, фильтровали через стерильный мембранный фильтр 0,22 мкм. Разделение выполняли в градиенте элюции водного 0,1%-й р-ра трифторуксусной кислоты до 0,1%-й р-ра трифторуксусной кислоты в 50%-м ацетонитриле. Детекцию вели по поглощению на длинах волн 220 и 280 нм. Анализ хроматограмм проводили в ПО ChromLab.

Методы оценки способности пептидных фракций влиять на жизнедеятельность микроорганизмов. Антибактериальную активность как исходных растворов продуктов пчеловодства, так и пептидных фракций определяли в диско-диффузионном методе (ДДМ) и методом серийных разведений на культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae*, высеванных с раневых поверхностей больных. При оценке результатов ДДМ руководствовались данными EUCAST (контроль — цефтриаксон), при оценке результатов метода серийных разведений критерием наличия антибактериальной активности считали отсутствие роста микроорганизмов во всех пробах одной повторности. Концентрацию пероксида водорода в образцах пчелиного мёда определяли титриметрически с тиосульфатом натрия.

Способность пептидных фракций влиять на общую дегидрогеназную и каталазную активность микроорганизмов определяли на суточных инокулятах *S. aureus* и *E. coli*, выращенных на сахарном агаре при 37 °С. В суточные инокуляты добавляли 50 мкл очищенных фракций пептидов (концентрация 100 мкг/мл; в контроль добавляли 50 мкл стерильного 0,9%-го р-ра NaCl). После суток инкубации при 37 °С из проб готовили бесклеточный супернатант: к пробам добавляли 100 мкл 0,02%-го р-ра тритона X-100, гомогенизировали в течение 10 мин. После содержимое инкубировали 2 ч при 4 °С, затем центрифугировали 15 мин при 5000 g. В супернатанте общую дегидрогеназную активность определяли спектрофотометрически ($\lambda = 485$ нм) по количеству экстрагированного гексаном формазана, образованного из 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида после 12 ч инкубации при комнатной температуре в пересчёте на 1 мг белка. Каталазную активность определяли спектрофотометрически: к 0,1 мл супернатанта добавляли 2 мл 0,03%-го р-ра пероксида водорода и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 1 мл 4%-го р-ра молибдата аммония в 0,1 н растворе серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 410 нм. Активность выражали в мкат/мкг белка.

Методы оценки влияния пептидов на поведение животных в условиях хронического стресса. В качестве экспериментальных животных использовали самцов крыс линии Wistar массой 190-210 г (2 мес., n = 8), распределённых в экспериментальные группы по принципу аналогов (питомник ООО «СМК СТЕЗАР»). Крысы содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище, день и ночь по 12 ч каждый (если экспериментом не было предусмотрено иное). Принципиальная схема проведения эксперимента с животными представлена на рис. 1.

Для формирования состояния хронического стресса была выбрана модель хронического случайного умеренного стресса, в соответствии с которой на животных оказыва-

ется воздействие случайно выбранными стрессовыми факторами несколько раз в сутки (Willner, 1987): пищевая или водная депривация, иммобилизация в рестрейнере, помещение клетки на шейкер, нарушение цикла свет/тьма, содержание при 4 °С в течение, вынужденное плавание. Параллельно с формированием хронического стресса животным опытных групп интраназально вводили водные растворы пептидов в объёме 8 мкл.

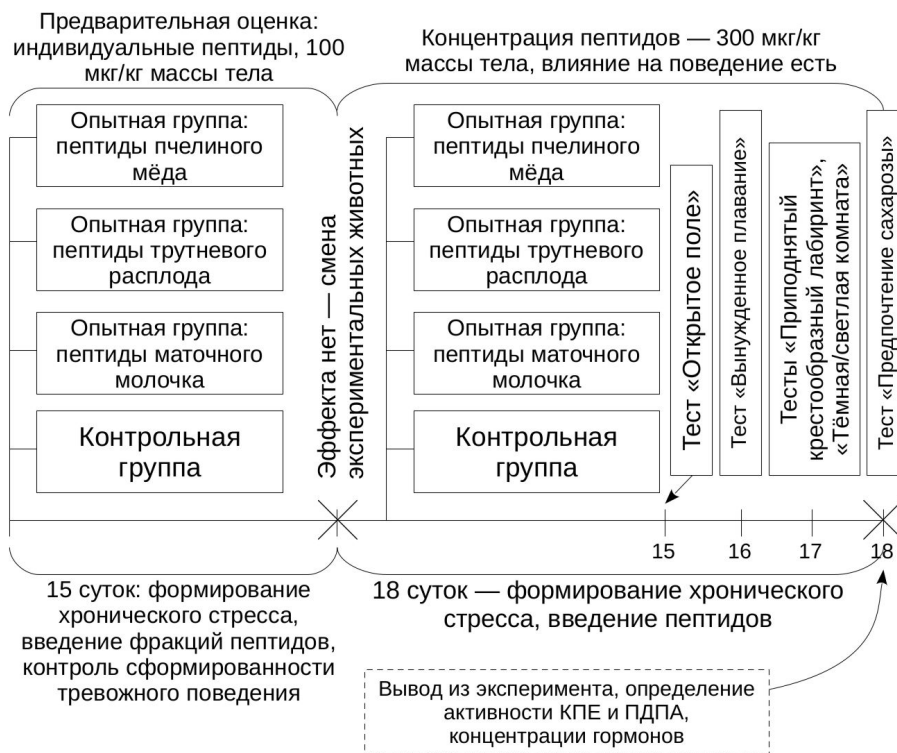


Рисунок 1. Принципиальная схема эксперимента по оценке влияния пептидов продуктов пчеловодства на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса

Для предварительной оценки биологической активности выделенных пептидов экспериментальным животным вводили индивидуальные фракции пептидов в концентрации 100 мкг/кг массы тела. После того как было установлено, что индивидуальные пептиды в такой концентрации не оказывают влияния на поведение крыс, формирование хронического стресса было начато заново с новыми животными. На этом этапе крысам вводили смесь очищенных пептидов продуктов пчеловодства в концентрации 300 мкг/кг массы тела, что согласуется со сложившейся практикой исследований биологически активных пептидов с интраназальным способом введения (Sharma, 2021). Особям контрольной группы вводили стерильный 0,9% р-р NaCl в том же объёме и в то же время, что и животным опытных групп.

Для оценки уровня тревожности животных использовали такие стандартные поведенческие тесты, как «Открытое поле», «Вынужденное плавание», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Тёмная/светлая комната», «Предпочтение сахарозы» (Мионов, 2012).

Методы определения концентрации гормонов стресса и активности ферментов обмена регуляторных нейропептидов. После проведения поведенческих тестов животные были выведены из эксперимента путём декапитации на гильотине с последую-

ющим забором сыворотки крови, надпочечников, гипофиза, гипоталамуса, стриатума, гиппокампа, миндаля, четверохолмия и продолговатого мозга. В сыворотке крови была определена концентрация кортикостерона и АКТГ методом ИФА (Хема и Cloud Clone).

Активность КПЕ в нервной ткани, гипофизе и надпочечниках определяли с использованием дансил-фен-ала в качестве субстрата и GEMSA в качестве ингибитора (Fricker, 1982). Концентрацию флюоресцирующего продукта реакции после экстракции хлороформом определяли на Флюорате-02-АБФЛ-Т. Активность ПДПА в нервной ткани, гипофизе и сыворотке крови определяли с использованием карбоксибензоил-гли-гли-арг в качестве субстрата и каптоприла в качестве ингибитора (Кручинина, 2016). Концентрацию продукта — гли-арг — определяли нингидриновым методом на КФК-3.

Статистическая обработка данных. При обработке данных определяли нормальность распределения, рассчитывая показатель Шапиро-Уилка. Для оценки разности показателей нормальных распределений использовали t-критерий Стьюдента, для непараметрического анализа определяли U-критерий Манна-Уитни. Для средних значений рассчитывали показатели стандартного отклонения. Расчёты проводили с использованием ПО LibreOffice Calc и пакета программ R. В аналитических сериях было по три повторности. Статистически значимыми полученные после расчётов результаты признавались при $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований

Характеристика пептидного спектра пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода. Для оценки содержания пептидных продуктов в пчелином мёде и маточном молочке был использован метод гель-фильтрации на сефадексе G-25 с предварительным осаждением белковых продуктов 10%-м р-ром трихлоруксусной кислоты. При сравнении хроматограмм до осаждения и после было получено, что в пчелином мёде и маточном молочке в среднем 50% от белков приходится на пептиды (рис. 2 и 3).

На рис. 4 представлен профиль элюции раствора пептидов продуктов пчеловодства, полученного после ультрафильтрации, при их разделении методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

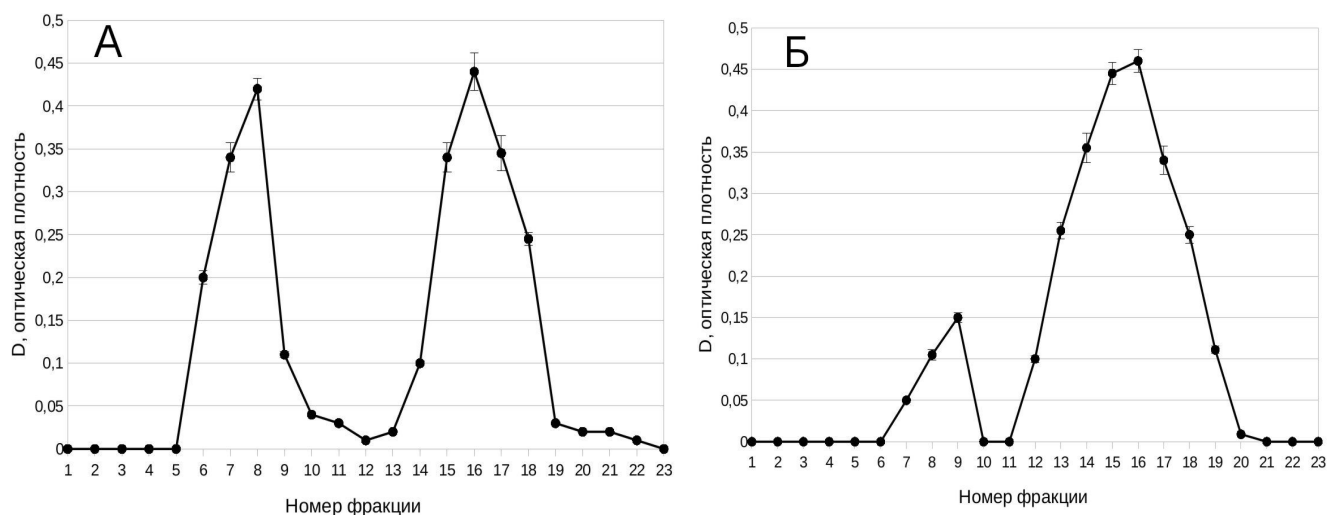


Рисунок 2. Профили элюции Лоури-положительных продуктов пчелиного мёда на сефадексе G-25 до (А) и после (Б) осаждения белков трихлоруксусной кислотой

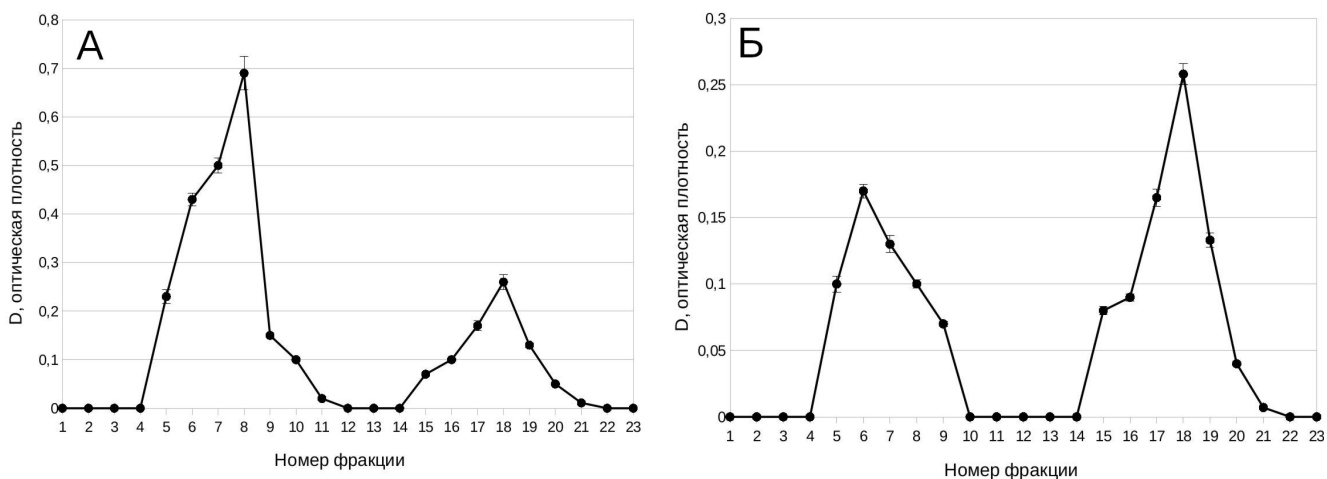


Рисунок 3. Профили элюции Лоури-положительных продуктов маточного молочка на сефадексе G-25 до (А) и после (Б) осаждения белков трихлоруксусной кислотой

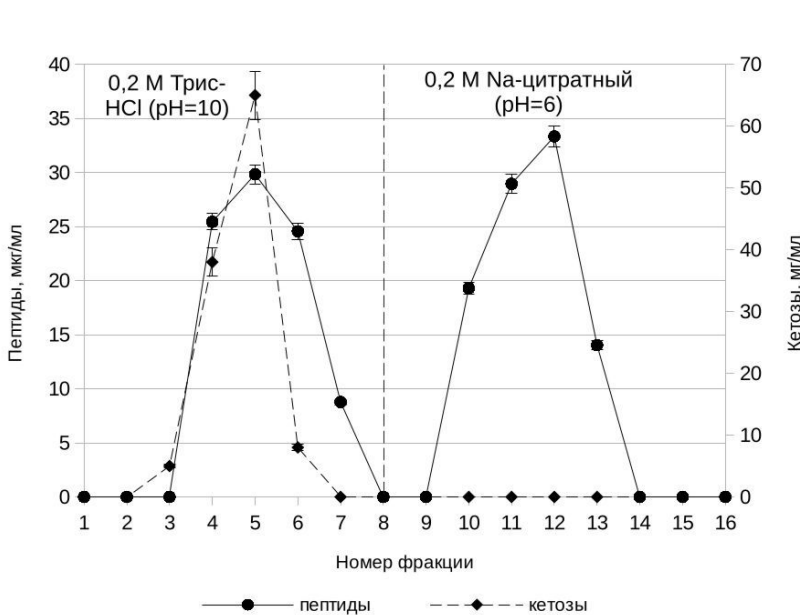


Рисунок 4. Профиль элюции пептидов продуктов пчеловодства на DEAE-целлюлозе

При контроле концентрации белковых продуктов с использованием метода Лоури на всех этапах выделения и очистки было получено, что после ионообменной хроматографии из трутневого расплода в виде низкомолекулярных пептидов удаётся выделить в среднем 1,6% белковых веществ, из маточного молочка — 5%, из пчелиного мёда — 12,1% (в пересчёте на общее содержание белковых веществ). Низкий выход объясним, во-первых, малой долей пептидов в общем содержании белковых молекул в продуктах пчеловодства. Во-вторых, во время очистки ультрафильтрата методом ионообменной хроматографии около половины пептидов не поддаётся очистке из-за невозможности их разделения в заданных условиях, поэтому практический выход меньше теоретического минимум на 40-50%.

Результаты по разделению нативных растворов продуктов пчеловодства и их ультрафильтратов методом электрофореза в полиакриламидном геле при денатурирующих условиях представлены на рис. 5, на рис. 6 — результаты оценки молекулярной массы соответствующих пептидов. Присутствие в обработанных данных пиков, соответствующих пептидам с массой более 5 кДа можно объяснить особыми физико-химическими свойствами отдельных пептидных молекул. При незначительно большей порога молекулярной массе данные пептиды имеют схожий размер глобул с более лёгкими пептидами, что позволяет им проходить через поры фильтра, однако молекулярные массы всех пептидов не отличаются более чем на 1 кДа, чем пороговое значение мембраны.

При контроле концентрации белковых продуктов с использованием метода Лоури на всех этапах выделения и очистки было получено, что после ионообменной хроматографии из трутневого расплода в виде низкомолекулярных пептидов удаётся выделить в среднем 1,6% белковых веществ, из маточного молочка — 5%, из пчелиного мёда — 12,1% (в пересчёте на общее содержание белковых веществ). Низкий выход объясним, во-первых, малой долей пептидов в общем содержании белковых молекул в продуктах пчеловодства. Во-вторых, во время очистки ультрафильтрата методом ионообменной хроматографии около половины пептидов не поддаётся очистке из-за невозможности их разделения в заданных условиях, поэтому практический выход меньше теоретического минимум на 40-50%.

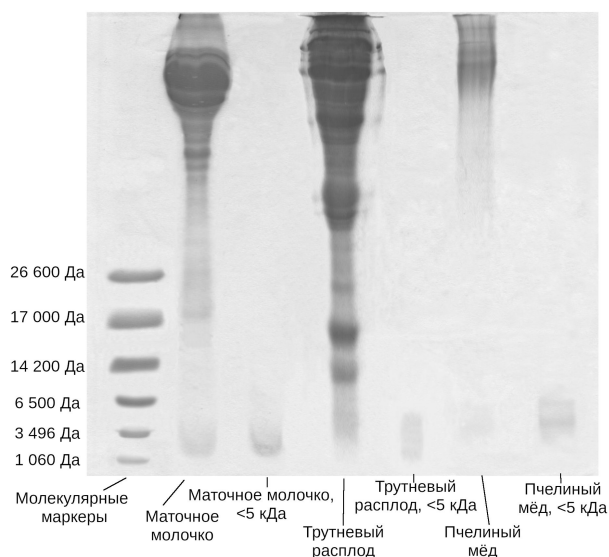


Рисунок 5. Результаты электрофореза растворов продуктов пчеловодства (слева)

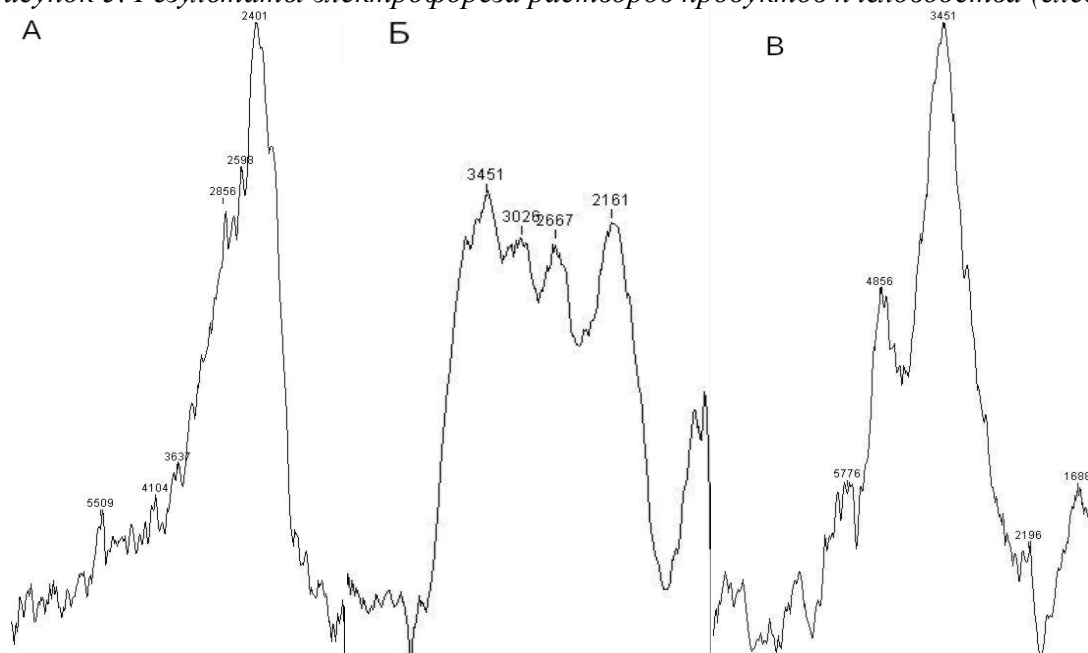


Рисунок 6. Молекулярная масса пептидов ультрафильтрата маточного молочка (А), трутневого расплода (Б) и пчелиного мёда (В) (внизу)

На рис. 7-9 представлены профили элюции образцов ультрафильтрата и очищенных растворов пептидов маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда, полученные с использованием метода ОФ-ВЭЖХ.

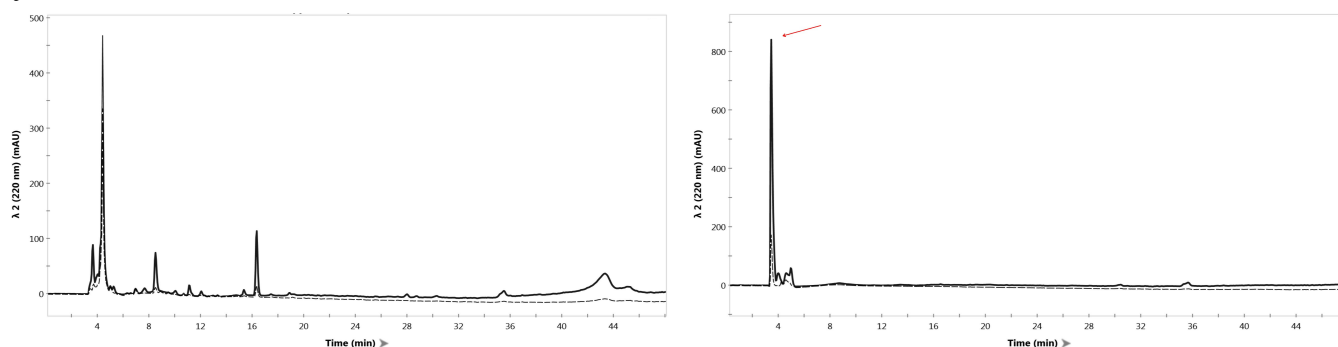


Рисунок 7. Хроматограммы ВЭЖХ-разделения ультрафильтрата (слева) и очищенного пептидного раствора (справа) трутневого расплода; штрих — поглощение на длине волны 280 нм, сплошная линия — поглощение на длине волны 220 нм

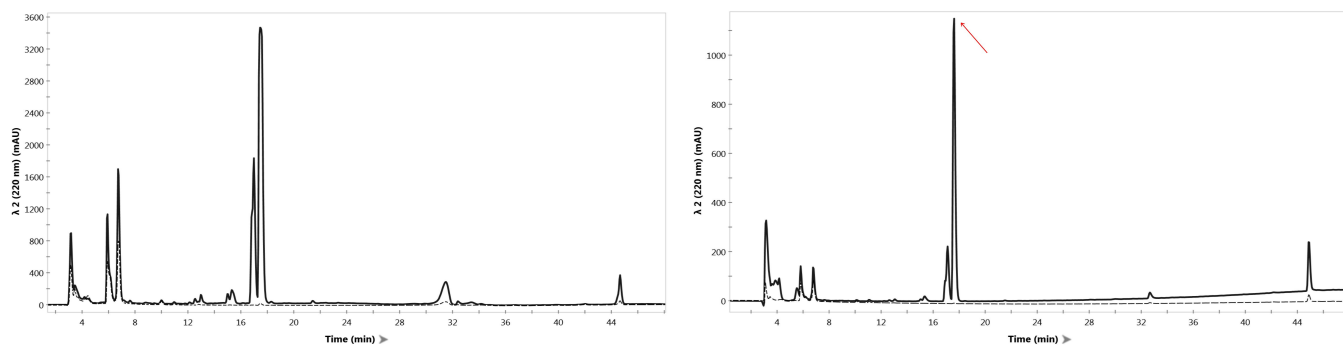


Рисунок 8. Хроматограммы ВЭЖХ-разделения ультрафильтрата (слева) и очищенного пептидного раствора (справа) маточного молочка; штрих — поглощение на длине волны 280 нм, сплошная линия — поглощение на длине волны 220 нм

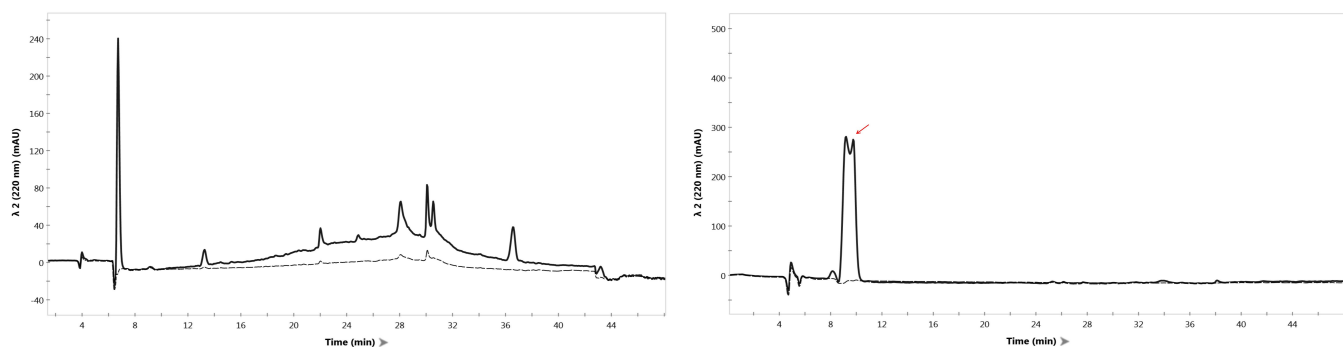


Рисунок 9. Хроматограммы ВЭЖХ-разделения ультрафильтрата (слева) и очищенного пептидного раствора (справа) пчелиного мёда; штрих — поглощение на длине волны 280 нм, сплошная линия — поглощение на длине волны 220 нм

Таким образом, пептидный спектр пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода отличается значительным разнообразием. Данные электрофореза в денатурирующих условиях показывают эффективность метода ультрафильтрации для получения растворов молекул продуктов пчеловодства с необходимой молекулярной массой.

Определение влияния пептидов продуктов пчеловодства на жизнедеятельность микроорганизмов. При определении антибактериальной активности в ДДМ было установлено, что пептиды в концентрации 5 мкг/диск не оказывают антибактериального действия на использованные штаммы микроорганизмов. В методе серийных разведений в концентрациях 50, 20 и 10 мкг/мл также не было найдено антибактериального эффекта у выделенных пептидов. В части проб в обоих тестах наблюдались сомнительные результаты, т. е. подавление роста бактериальных культур доходило до субпороговых значений наличия антибактериальной активности, что можно объяснить присутствием в растворах пептидов продуктов пчеловодства малых количеств антимикробных пептидов.

Результаты изучения влияния пептидов продуктов пчеловодства на общую дегидрогеназную и каталазную активности показаны на рис. 10 и 11.

Было установлено, что пептиды маточного молочка увеличивают по сравнению с контролем общую дегидрогеназную активность в 1,16 раз для *E. coli* и 1,86 раза для *S. aureus*; каталазную — на 19,4% и 52,3% для *E. coli* и *S. aureus* соответственно. Пептиды трутневого расплода увеличивают по сравнению с контролем общую дегидрогеназную активность на 61,9% для *E. coli* и 161,8% для *S. aureus*; каталазную — на 11,8% и

79,4% для *E. coli* и *S. aureus* соответственно.

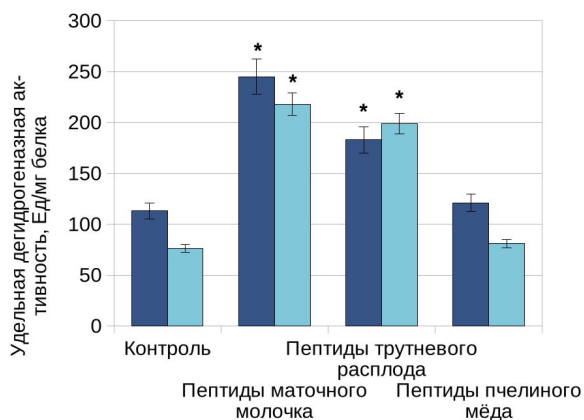


Рисунок 10. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на удельную дегидрогеназную активность штаммов *S. aureus* и *E. coli*. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — *E. coli*, ■ — *S. aureus*)

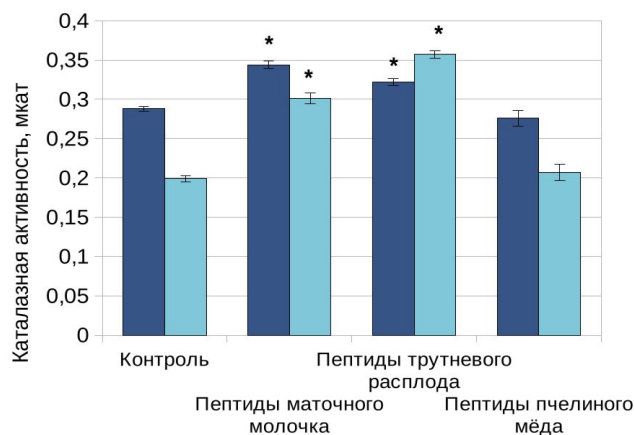


Рисунок 11. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на каталазную активность штаммов *S. aureus* и *E. coli*. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — *E. coli*, ■ — *S. aureus*)

Влияние пептидов продуктов пчеловодства на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса. При введении индивидуальных пептидных фракций (соответствующие пики помечены на рис. 7-9 стрелкой) в концентрации 100 мкг/кг массы тела в условиях хронического стресса у животных не было зафиксировано изменений в поведении. По этой причине было решено увеличить концентрацию вводимых растворов, однако в силу нерациональности выделения отдельных пептидных фракций была использована совокупность пептидов каждого продукта пчеловодства, очищенная от низкомолекулярных примесей методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, в увеличенной концентрации — 300 мкг/кг массы тела. Для этого были использованы животные, не подвергавшиеся никаким воздействиям, для которых формирование состояния хронического стресса началось по такой же схеме.

На 15-е сутки после введения пептидов либо 0,9%-го р-ра NaCl животные были подвергнуты первому стрессовому фактору, а во второй половине дня прошли тест «Открытое поле» (рис. 12).

На 16-е сутки вместо запланированного стрессового воздействия животные прошли тест «Вынужденное плавание» (рис. 13), что равноценно по силе аналогичному стрессовому фактору, применяемому ранее.

На 17-е сутки в первой половине дня животные прошли тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (рис. 14), а во второй половине — «Тёмная/светлая комната» (рис. 15).

На 18-е сутки был проведён тест «Предпочтение сахарозы» (рис. 16), после чего животные были выведены из эксперимента. В дни проведения поведенческих тестов крысы продолжали получать соответствующие их группам растворы интраназально.

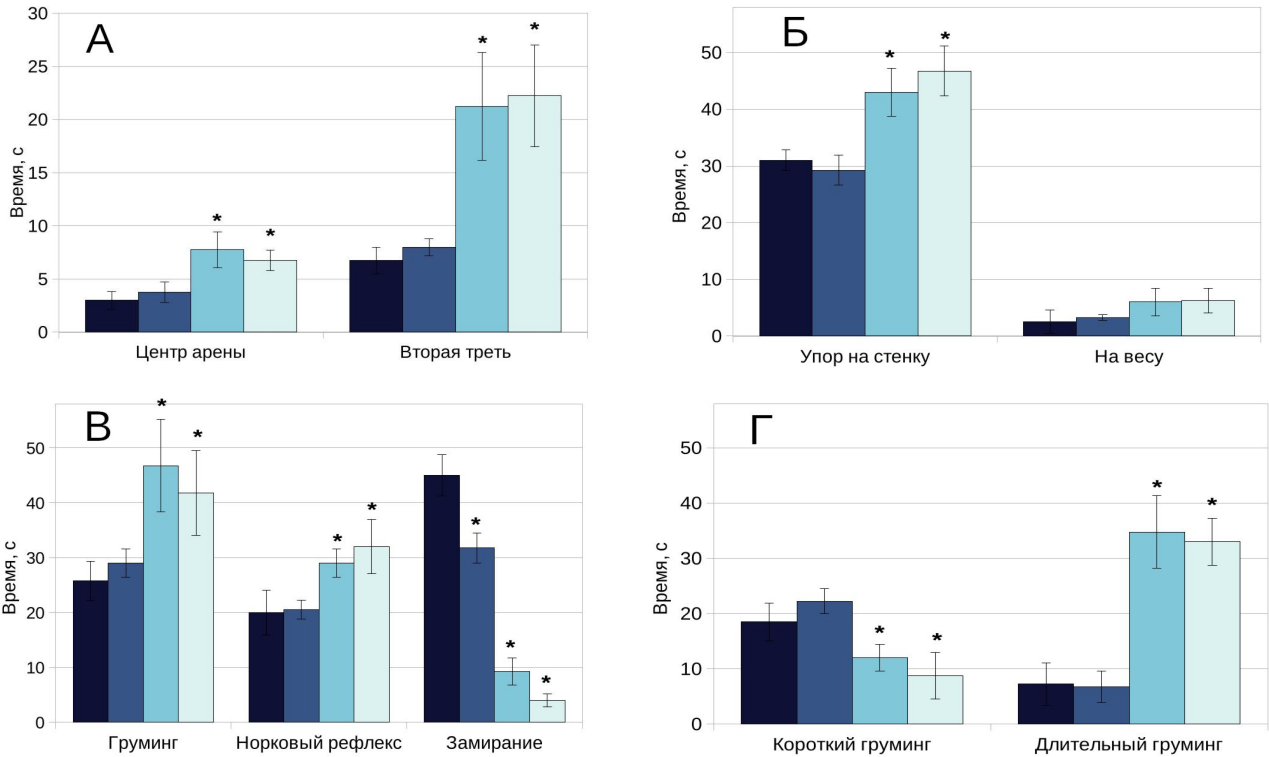


Рисунок 12. Результаты теста «Открытое поле» при введении пептидов продуктов пчеловодства в концентрации 300 мкг/кг массы тела. А) горизонтальная двигательная активность; Б) вертикальная двигательная активность; В) формы поведения; Г) распределение времени груминга по типам. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

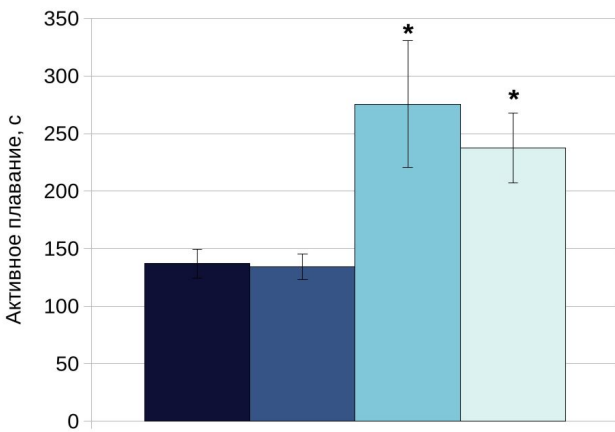


Рисунок 13. Результаты теста «Вынужденное плавание». * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

В тесте «Открытое поле» у животных, получавших пептиды маточного молочка, по сравнению с животными контрольной группы было увеличено время общего груминга на 62,1% (время короткого груминга снижено на 52,7%, а длительного увеличено на 28,2%), время проявления норкового рефлекса на 60%, время климбинга на 50,8%, время вставания на задние лапы на 150%, время нахождения в центре арены в 1,25 раза и во второй трети 2,3 раза, в то время как было снижено время замирания на 91,1%. У животных, получавших пептиды трутневого расплода, по сравнению с животными контрольной группы было увеличено время общего груминга на 81,6% (время короткого груминга было снижено на 35,1%, а длительного увеличено на 81,6%), время проявления норкового рефлекса на 45%, время климбинга на 38,7%, время вставания на задние лапы в 1,4 раза, время нахождения в центре арены в 1,58 раза и во второй трети в 2,15 раза, в то время как было снижено время замирания на 79,4%.

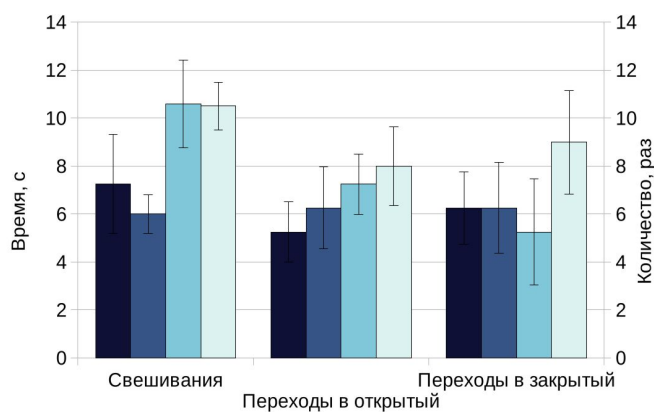
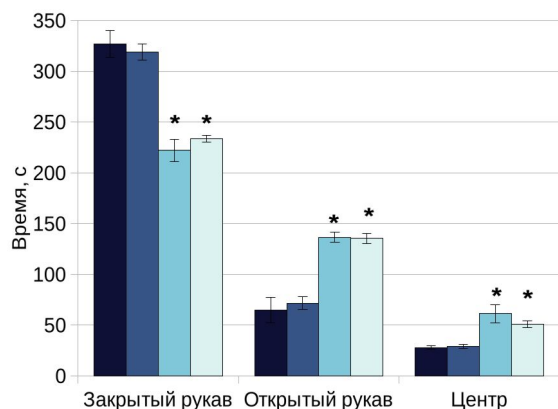


Рисунок 14. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Слева — распределение времени нахождения животных в различных частях установки; справа — формы поведения животных. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

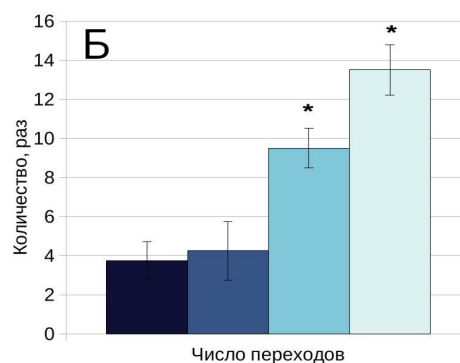
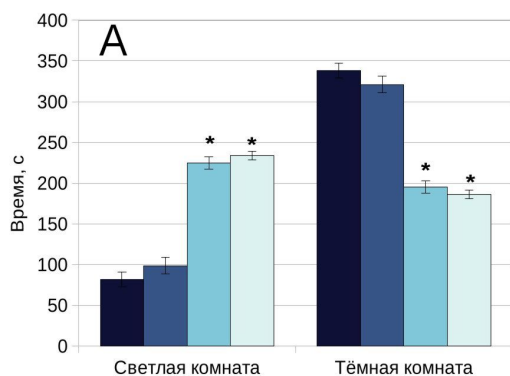


Рисунок 15. Результаты теста «Тёмная/светлая комната»: А) распределение времени нахождения в тёмной и освещённой частях установки; В) количество переходов через перегородку между отсеками. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

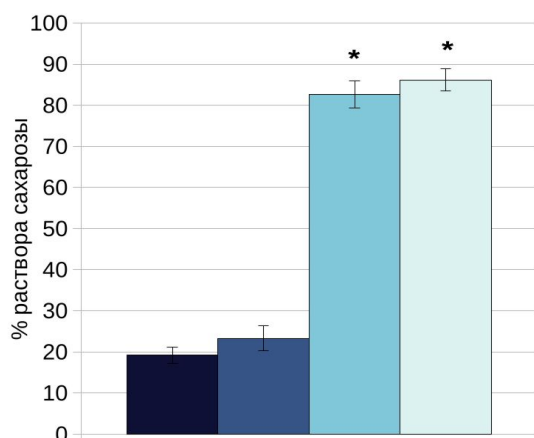


Рисунок 16. Результаты теста «Предпочтение сахарозы» (доля потреблённого раствора сахарозы). * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

В тесте «Вынужденное плавание» крысы, получавшие пептиды маточного молочка и трутневого расплода, на 73,2% и 101,1% соответственно больше времени проводят в состоянии активного плавания, заключающееся в активных попытках выбраться из сосуда с водой, что свидетельствует о снижении уровня хронического стресса у животных. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» животные, получавшие пептиды маточного молочка, по сравнению с животными контрольной группы на 28,6% меньше времени проводили в закрытом рукаве и в 1,09 раза больше в открытом и на 82,1% на центральной площадке, а животные, получавшие пептиды трутневого расплода меньше проводили

времени в закрытом рукаве на 32,1%, больше в открытом рукаве в 1,1 раза и в центре установки в 1,19 раза. Не было зафиксировано для аналогичных параметров статистически значимого влияния со стороны пептидов пчелиного мёда, а также изменений среди животных всех экспериментальных групп в параметрах двигательной активности, т. к. время свешивания и количество переходов в открытый и закрытые рукава статистически не различались.

В тесте «Тёмная/светлая комната» у животных, получавших интраназально пептиды маточного молочка и трутневого расплода, статистически значимо увеличено время нахождения в ярко освещённой части установки по сравнению с животными контрольной группы в 1,86 и 1,75 раза соответственно, а время нахождения в тёмной части установки снизилось на 45% и 42,3% соответственно. Число переходов между отсеками опытной установки у животных, получавших пептиды маточного молочка и трутневого расплода, увеличилось в 2,6 и 1,53 раза соответственно, в то время как не было найдено статистически значимой разницы во всех параметрах между животными группы контроля и группы, получавшей пептиды пчелиного мёда.

В тесте «Предпочтение сахарозы» животные, интраназально получавшие пептиды маточного молочка и трутневого расплода в концентрации 300 мкг/кг массы тела, увеличили долю потреблённого раствора сахарозы в течение эксперимента в среднем до 86,2% и 82,7% соответственно, в то время как доля потреблённого раствора сахарозы для животных контрольной группы составила в среднем 19,2%. Не было зафиксировано статистически значимых различий в аналогичном параметре для животных, получавших пептиды пчелиного мёда.

Для оценки степени сформированности состояния хронического стресса также в сыворотке крови животных контрольной, опытных и интактной групп была определена концентрация гормонов стресса — АКТГ и кортикостерона — методом ИФА (рис. 17).

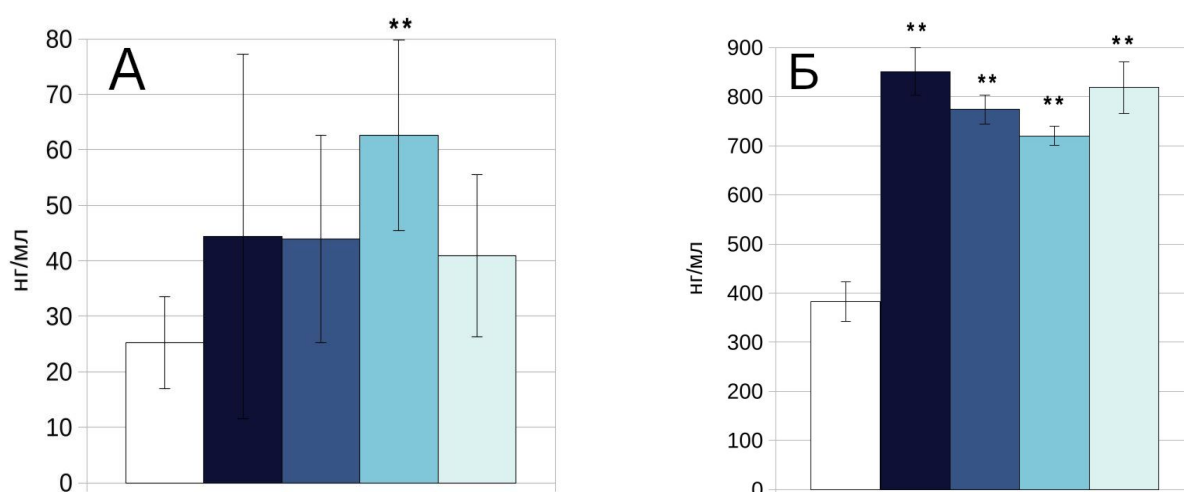


Рисунок 17. Концентрации гормонов стресса в сыворотке крови крыс, получавших пептиды продуктов пчеловодства в условиях хронического стресса: А) уровень адренокортикотропного гормона; Б) уровень кортикостерона. ** — значение достоверности $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой (□ — интактная, ■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

Статистически достоверное увеличение концентрации кортикостерона в сыворотке крови у животных, подвергнутых хроническому стрессу, по сравнению с интактными свидетельствует о его сформированности. Концентрация кортикостерона у интактных крыс составила $382,5 \pm 40,9$ нг/мл, у крыс контрольной группы — $851,25 \pm 48,2$ нг/мл. Концентрация кортикостерона животных, получавших пептиды пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода составила $773,75 \pm 29,6$ нг/мл, $818,75 \pm 52,7$ нг/мл и $720 \pm 19,6$ нг/мл соответственно. Значимое изменение в уровне АКТГ зафиксировано было только для животных, получавших пептиды трутневого расплода. Так, у животных интактной группы концентрация АКТГ составила $25,25 \pm 8,35$ нг/мл, а у контрольных и получавших пептиды пчелопродуктов $44,36 \pm 32,8$ нг/мл, $43,94 \pm 18,7$ нг/мл, $62,57 \pm 17,15$ нг/мл и $40,94 \pm 14,62$ нг/мл соответственно. Достоверных изменений в концентрации АКТГ и кортикостерона между животными опытными и контрольной групп зафиксировано не было.

Анализ совокупности полученных данных позволяет сказать, что в условиях хронического стресса постоянное интраназальное введение очищенных пептидов маточного молочка и трутневого расплода снижает выраженность тревожного поведения самцов линии Wistar.

Влияние пептидов продуктов пчеловодства на активность ферментов обмена регуляторных пептидов. После выведения из эксперимента у животных были забраны гипофиз, гипоталамус, стриатум, гиппокамп, миндаля, четверохолмие, продолговатый мозг, надпочечники и сыворотка крови. Из образцов тканей были приготовлены гомогенаты. В образцах мозга, гипофиза и надпочечниках определили активность карбокси-пептидазы Е (рис. 18), а в образцах мозга, гипофиза и сыворотке крови — активность пептидил-дипептидазы А (рис. 19). Установлено, что интраназальное введение пептидов пчелиного мёда не приводит к статистически значимым различиям в уровне активности обоих ферментов ни в одном из исследованных образцов, и ни один из образцов используемых пептидов продуктов пчеловодства не повлиял на активность карбокси-пептидазы Е в надпочечниках. Также было установлено, что пептиды трутневого расплода и маточного молочка снижают ферментативную активность в гипофизе на 60% и 70% соответственно по отношению к животным контрольной группы, в гипоталамусе активность КПЕ повышается под действием пептидов трутневого расплода и маточного молочка на 94% и 172%, в стриатуме на 86% и 114%, в гиппокампе на 116% и 189%, в миндале снижается на 53% и 44%, в четверохолмии повышается на 96% и 54%, в продолговатом мозге снижается на 37% и 44% соответственно. Выявлено, что пептиды маточного молочка и трутневого расплода статистически достоверно по сравнению с животными контрольной группы понижают активность пептидил-дипептидазы А в гипофизе на 46% и 54%, гипоталамусе на 37% и 44%, стриатуме на 37% и 40%, миндале на 53% и 56%, четверохолмии на 57% и 54% и продолговатом мозге на 40% и 45% соответственно. Данные пептиды также не оказывают статистически значимого влияния на активность ПДПА в гиппокампе и сыворотке крови.

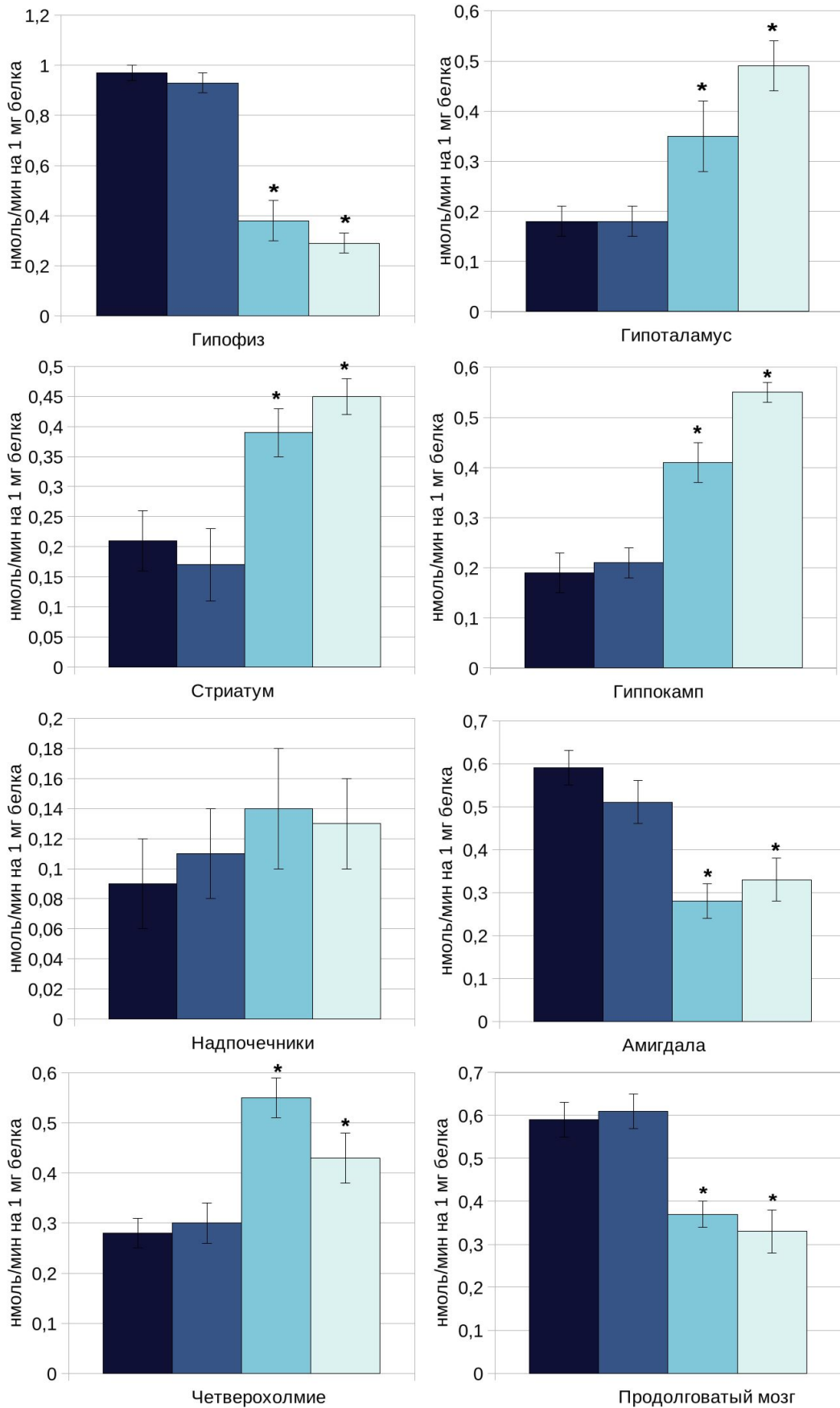


Рисунок 18. Показатели активности карбоксипептидазы E в надпочечниках и отделах мозга. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

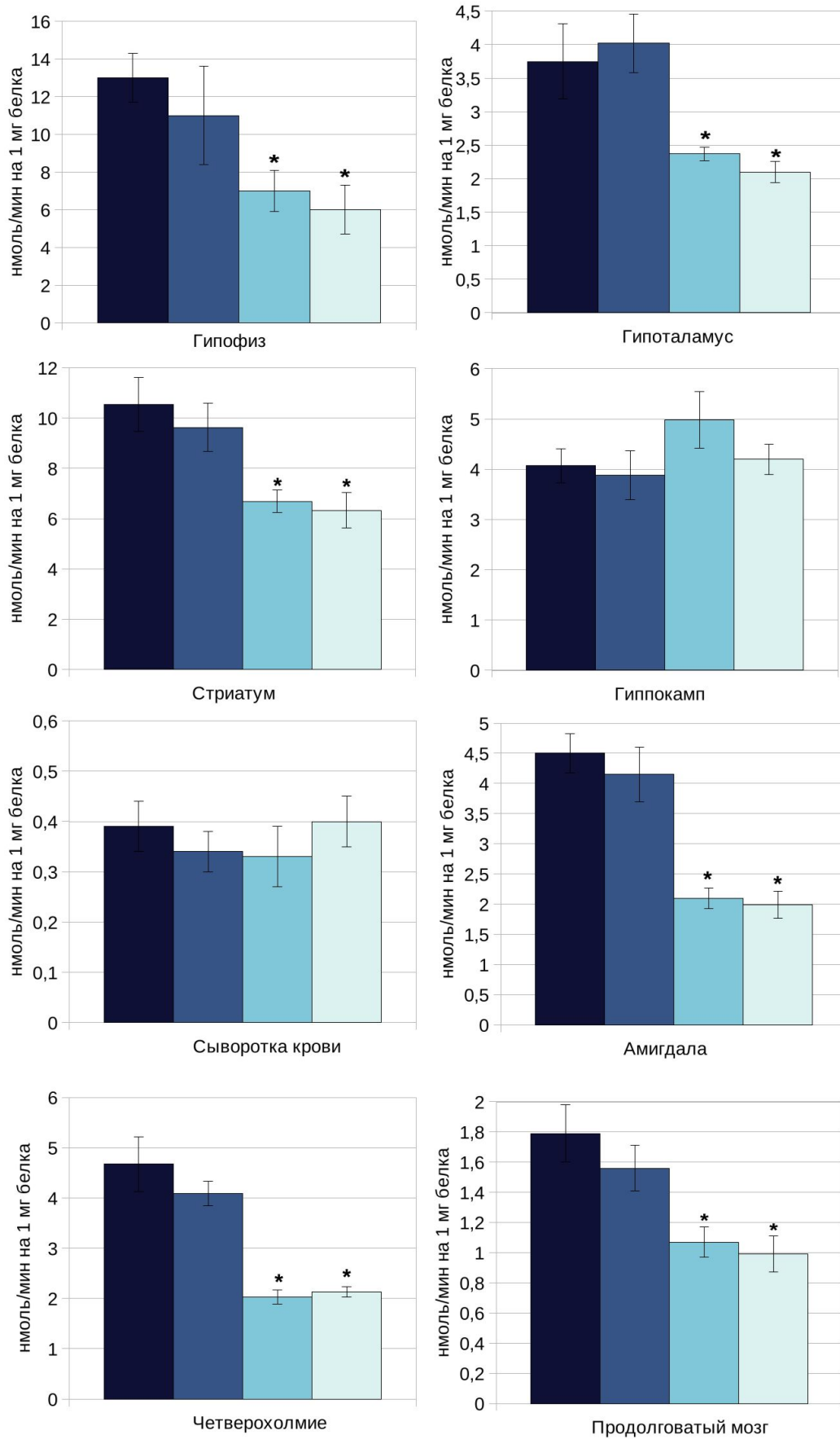


Рисунок 19. Показатели ферментативной активности ПДПА в сыворотке крови и отделах мозга.

* — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем (■ — контроль, ■ — пептиды пчелиного мёда, ■ — пептиды трутневого расплода, ■ — пептиды маточного молочка)

Для определения присутствия прямого влияния пептидов на активность КПЕ и ПДПА были проведены исследования в условиях *in vitro*. К гомогенату гипофиза интактных животных в контрольные пробы добавляли дистиллированную воду, в опытные пробы — равный объём растворов пептидов маточного молочка и трутневого расплода до конечной концентрации в 300 мкг/мл. Было установлено, что активность КПЕ и ПДПА статистически значимо не изменяется.

Таким образом, полученные данные об изменении активности ферментов обмена регуляторных пептидов при интраназальном введении низкомолекулярных пептидов маточного молочка и трутневого расплода свидетельствуют о глубоких нейрохимических изменениях, которые физиологически выражаются в снижении уровня тревожности экспериментальных животных. В условиях хронического стресса изменяется функционирование практически всех нейромедиаторных и пептидергической системы. Результаты эксперимента также свидетельствуют о том, что низкомолекулярные пептиды маточного молочка и трутневого расплода не оказывают прямого влияния на активность КПЕ и ПДПА. Следовательно, анксиолитический эффект этих пептидов реализуется через иные, пока ещё неизвестные механизмы биохимической регуляции.

ВЫВОДЫ

1. Применённая комбинация ультрафильтрации и хроматографических методов позволяет выделить и очистить пептиды маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда от низкомолекулярных примесей. Степень очистки в среднем составляет 5% для пептидов маточного молочка, 1,6% для гомогената трутневого расплода и 12,1% для пептидов пчелиного мёда (в пересчёте на общее содержание белковых веществ).
2. Пептидный спектр маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда характеризуется значительным разнообразием. На хроматограммах было выявлено присутствие 9 пиков индивидуальных пептидов в маточном молочке, 11 в гомогенате трутневого расплода и 10 в пчелином мёде. 7 из 9 выделенных пептидов маточного молочка при $pH = 10$ заряжены отрицательно, среди пептидов трутневого расплода и пчелиного мёда таких 2 и 4 соответственно. Среди пептидов маточного молочка массой до 5 кДа 5 имеют в своём составе аминокислоты с ароматическими радикалами, 4 в трутневом расплоде и 3 в пчелином мёде.
3. Низкомолекулярные пептиды трутневого расплода и маточного молочка при постоянном интраназальном введении в дозе 300 мкг/кг массы тела в условиях хронического стресса снижают интенсивность проявления поведения, ассоциированного с тревогой, у экспериментальных животных. Например, в тесте «Открытое поле» увеличивается продолжительность длительного груминга на 81,5% и 62,1% соответственно, время проявления норкового рефлекса было увеличено на 45% и 60% соответственно. В тесте «Тёмная/светлая комната» время нахождения в светлом отсеке опытной установки было увеличено в 2,75 и 2,86 раза соответственно.

4. Под действием низкомолекулярных пептидов трутневого расплода и маточного молочка изменяется активность карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A в нервной ткани и гипофизе крыс. Активность карбоксипептидазы E снижается в гипофизе (на 60% и 70% соответственно), амигдале (на 53% и 44%) и продолговатом мозге (на 37% и 44%), но повышается в гипоталамусе (на 94% и 172%), стриатуме (на 86% и 114%), гиппокампе (в 2,16 и 2,89 раза) и четверохолмии (на 96% и 54%). Активность пептидил-дипептидазы A снижается в гипофизе (на 46% и 54%), гипоталамусе (на 37% и 44%), стриатуме (на 37% и 40%), амигдале (на 53% и 56%), четверохолмии (на 57% и 54%) и продолговатом мозге (на 40% и 45%). Низкомолекулярные пептиды продуктов пчеловодства не оказывают влияния на активность обоих ферментов в сыворотке крови, надпочечниках и *in vitro*, а также концентрацию АКТГ и кортикостерона.

5. Выделенные низкомолекулярные пептиды продуктов пчеловодства не оказывают выраженного антибактериального эффекта на культуры *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae*, однако способны изменять общую дегидрогеназную и каталазную активность *E. coli* и *S. aureus*.

Перспективы дальнейшей разработки темы лежат в области более детального изучения структуры выделенных пептидов современными методами биохимии (масс-спектрометрия, секвенирование и т. д.), а также механизмов проявления их биологической активности.

К полученным результатам можно сделать следующие **рекомендации по практическому использованию**:

- пептиды маточного молочка и трутневого расплода массой до 5 кДа перспективны для разработки биопрепарата, обладающего анксиолитическим эффектом;
- разработанный способ выделения низкомолекулярных пептидов (массой до 5 кДа) из продуктов пчеловодства возможно применить для выделения пептидов из другого природного сырья.
- полученные результаты возможно использовать в учебном процессе при подготовке бакалавров по направлениям 06.03.01 Биология, 19.03.01 Биотехнология.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ:

1. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д. Способ выделения и очистки низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства с использованием хроматографических методов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, №1. С. 107-115.
2. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д. Изучение влияния пептидов продуктов пчеловодства на активность пептидил-дипептидазы A в сыворотке крови и нервной ткани крыс в условиях хронического стресса // Технологии живых систем. 2023. Т. 20, №2. С. 73-80.
3. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д., Гамзин С. С., Левашова О. А. Оценка изменения активности карбоксипептидаз под действием пептидов продуктов пчеловодства при хроническом стрессе // Вестник МГПУ. Серия: Естественные науки. 2023. № 3(51). С. 24-36.

4. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д., Левашова О. А., Гамзин С. С. Изучение влияния пептидов продуктов пчеловодства на поведение крыс в условиях хронического стресса // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2023. Т. 44. С. 68-77.

Статьи в других журналах и сборниках материалов научно-практических конференций:

5. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д., Бичурина Л. А., Сорокин И. А. Изучение антибактериальной активности пептидных фракций маточного молочка и трутневого расплода // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2022. № 4(64). С. 97-106.

6. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д., Бичурина Л. А. Антибактериальная активность пчелиного мёда и его пептидных фракций // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2021. Т. 7, № 3. С. 101-111.

7. Генгин М. Т., **Клыченков С. В.**, Соловьёв В. Б., Карпова Г. А. Перспективный метод оценки качества меда // Пчеловодство. 2017. № 2. С. 51-52.

8. **Клыченков С. В.** Антимикробные пептиды меда, перспективы их получения и использования // Вестник Пензенского государственного университета. 2017. № 4(20). С. 60-66.

9. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на степень развития ангедонии у крыс в условиях хронического стресса // Научный аспект. 2022. Т. 5, № 5. С. 601-607.

10. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на степень развития тревожности у крыс в условиях хронического стресса // От молекулы к системной организации физиологических функций: Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения член-корреспондента РАН, профессора А.В. Завьялова, 18–20 апреля 2023 года. С. 116-119.

11. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д. Влияние пептидных фракций продуктов пчеловодства на поведение крыс в тесте «Открытое поле» при хроническом стрессе // Беккеровские чтения: материалы II Всероссийской научно-практической конференции, 19–21 ноября 2022 года. С. 122-126.

12. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д., Бичурина Л. А., Тугучев М. В. Определение минимальной ингибирующей концентрации пептидной фракции пчелиного мёда // Мир в эпоху глобализации экономики и правовой сферы: роль биотехнологий и цифровых технологий: сборник научных статей по итогам IX международной научно-практической конференции, Москва, 15–16 сентября 2021 года. С. 138-140.

13. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д. Выделение и анализ белковой фракции мёда хроматографическими методами // Роль вузовской науки в решении проблем АПК: сборник статей Всероссийской (национальной) научно-практической конференции, посвящённой 90-летию со дня рождения профессора Г.Б. Гальдина, Пенза, 24–25 октября 2018 года. Том I. С. 292-295.

14. **Клыченков С. В.**, Кручинина А. Д. Антибактериальные свойства продуктов пчеловодства // EurasiaScience: Сборник статей XII международной научно-практической конференции, Москва, 15 декабря 2017 года. Часть I. С. 22-24.