

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических и
естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ОЦЕНКА АНКСИОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ПРИ
ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ»**

Студент



Рахматулина Лейсан Азатовна

Руководитель



Кручинина А.Д.

Нормоконтролер



Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 19.06.23 № 14)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой



(протокол заседания ГЭК от 04.07.23 № 6)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Молекулярные аспекты развития тревоги	10
1.2 Анксиолитические препараты и их классификация	13
1.3 Молекулярные механизмы действия анксиолитиков	18
1.4 Доклинические исследования анксиолитических препаратов	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1 Объект исследования	32
2.2 Приготовление раствора трутневого расплода, ультрафильтрация	33
2.2.1 Очистка пептидов раствора трутневого расплода от углеводов, их разделение ионообменной хроматографией	35
2.2.2 Спектрофотометрическое определение концентрации пептидов	38
2.2.3 Концентрирование и очистка раствора пептидов от буферного раствора гель – фильтрацией	39
2.3 Организация эксперимента на лабораторных животных	40
2.4 Методы изучения специфической анксиолитической активности	41
2.4.1 Тест «Открытое поле»	42
2.4.2 Тест «Тёмная/светлая камера»	42
2.5 Статистическая обработка данных	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1 Очистка от углеводов и разделение белков и пептидов методом ионообменной хроматографии	45
3.2 Результат оценки поведения животных в тесте «Открытое поле»	48
3.3 Результат поведения животных в тесте «Тёмная/светлая камера»	57
Заключение	64
Список литературы	66

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Тревога стала неизбежной частью жизни современного общества. Стресс, депрессия, тревога настигает нас на каждом шагу. События, происходящие в мире, для человека - сильный удар. Хроническое стрессовое воздействие лежит в основе развития многих соматических заболеваний.

В соответствии с социологическими данными, распространённость тревожных расстройств колеблется от 3 до 30 %. По оценкам, каждый четвертый человек в мире хотя бы раз в жизни испытывает ту или иную форму тревожного расстройства. Тревожные расстройства в настоящее время классифицируются как распространённая медицинская проблема, а распространённость тревожных расстройств, вызванных различными причинами, у пациентов, составляет 12-70% [10].

По данным исследователей из университетов Шеффилда и Ольстера, проявление тревожных расстройств увеличились более чем на 20% после того, как премьер-министр Великобритании объявил о режиме самоизоляции [27]. Недавнее исследование, проведенное в Китае, выявило тревожные расстройства у 73,4 % испытуемых и депрессию у 50,7 % [36]. В России же за последние годы наблюдалось увеличение уровня тревоги на 45% [27].

Анксиолитики — это группа лекарственных препаратов, предназначенных для снижения тревожности и уровня страха у пациентов. Они могут оказывать различное действие на организм в зависимости от их химического состава и механизма действия.

В 1957 году термин "транквилизаторы", происходящий от латинского слова "tranquillo-are", что означает "делать спокойным, безмятежным", был введен в медицинскую литературу для обозначения психотропных препаратов, которые в основном применяются для лечения неврозов, состояний психического напряжения и страха. В отличие от

нейролептических веществ, большинство транквилизаторов не обладает ярко выраженным антипсихотическим эффектом.

Для лечения психических заболеваний в прошлом имелся ограниченный и недостаточно специфичный арсенал лекарственных средств. Для достижения данной цели использовались препараты снотворного и седативного действия, такие как инсумен и кофеин. Для лечения судорог и шизофрении применялся препарат коразол. В случае невротических расстройств основным средством были бромиды, а также седативные препараты растительного происхождения.

Психотропные препараты характеризуются специфическим и благоприятным воздействием на психическое функционирование, что гарантирует терапевтическую эффективность при расстройствах центральной нервной системы.

Функционирование центральной нервной системы не является постоянным, оно подвержено изменениям, как в периоды бодрствования, так и в рамках циркадных ритмов, регулирующих смену дня и ночи.

Диапазон нормальной активности центральной нервной системы представляет собой только одну из множества возможных форм активности. Каждое отклонение в сторону снижения активности указывает на возрастающее ограничение психомоторной и психической функции, независимо от того, является ли его причиной эндогенный фактор (связанный с заболеванием) или экзогенный фактор (такой как алкоголь или наркотики).

Основным признаком транквилизаторов является способность ликвидировать беспокойство, тревогу и страх, уменьшать внутреннее напряжение, повышенную раздражительность, бессонницу и иные симптомы невротических, неврозоподобных, психопатических и психопатоподобных состояний, а также вегетативных дисфункций.

Основными свойствами транквилизаторов являются: снятие тревоги, беспокойства и страха, уменьшение внутреннего напряжения и улучшение

невротических и неврозоподобных симптомов, психотических и психоподобных состояний, таких как, повышенная раздражительность, бессонница и дизавтономия.

Поэтому основными мишенями для применения транквилизаторов являются разнообразные тревожно-фобические синдромы непсихотического уровня — как острые, так и хронические, которые развиваются в рамках так называемых пограничных состояний [23].

Кроме анксиолитического действия, транквилизаторы проявляют основные клинико-фармакологические эффекты, такие как седативное, миорелаксирующее, противосудорожное, гипнотическое и фитостабилизирующее действие, а также обладают амнестическим эффектом.

Помимо выше сказанного, многие анксиолитики могут вызывать лекарственную зависимость. Однако у разных транквилизаторов отмечается вариабельность в выраженности указанных свойств, что требует учета при выборе подходящего препарата для индивидуального пациента. В дополнение к вышесказанному, многие анксиолитики могут вызывать зависимость. Однако выраженность этих свойств у разных транквилизаторов различна и должна учитываться при выборе препарата для конкретного пациента. В настоящее время исследования проводятся с целью разработки препаратов, обладающих изолированными анксиолитическими свойствами в рамках рассматриваемой группы, что способствует минимизации нежелательных побочных эффектов. В настоящее время ведутся исследования по разработке препаратов с изолированными анксиолитическим действием, что позволяет свести к минимуму нежелательные побочные эффекты.

С точки зрения химической структуры, транквилизаторы включают в себя различные классы химических соединений. Современные основные препараты этой группы являются производными бензодиазепина. Кроме того, карбаматы пропандиола (например, мепротан и другие) и

представители других химических групп продолжают сохранять свою значимость в этой области. Механизмы действия транквилизаторов до сих пор остаются недостаточно понятными.

Результаты нейрофизиологических исследований, под воздействием транквилизаторов показали, что возбудимость подкорковых областей мозга, таких как лимбическая система, таламус и гипоталамус, снижается под воздействием этих лекарств. Эти области отвечают за осуществление эмоциональных реакций и регуляцию взаимодействия между ними и корой большого мозга. С точки зрения нейрохимических механизмов, различные транквилизаторы отличаются по своим действиям. Они оказывают относительно слабое влияние на порадренергические, дофаминергические и серотонинергические системы. Однако бензодиазепиновые транквилизаторы активно воздействуют на гамма-аминомаслянокислотные (ГАМК) системы, усиливая центральное гамкергическое (тормозное) действие.

Транквилизаторы широко применяются как в стационарных, так и в амбулаторных условиях и являются наиболее широко используемыми. Их область применения выходит за пределы психиатрии и охватывает множество соматических заболеваний, неврологических расстройств, хирургии, анестезиологии (включая премедикацию и обеспечение анальгезии), онкологии, дерматологии, геронтологии, педиатрии, акушерства и гинекологии, а также другие области медицины. Более того, эти препараты используются практически здоровыми людьми для снятия негативных эмоциональных последствий стресса.

Их применение не ограничивается психиатрией, но также распространяется на многие физические и неврологические заболевания, хирургию, анестезиологию (включая премедикацию и анальгезию), онкологию, дерматологию, геронтологию, педиатрию, акушерство и гинекологию и другие области медицины. Кроме того, эти препараты используются здоровыми людьми для снятия негативных эмоциональных последствий стресса.

Поскольку транквилизаторы широко распространены и весьма актуальны, более удобно систематизировать современную информацию об этой группе препаратов, включая классификацию, механизм действия, фармакологические эффекты, побочные действия и безопасность применения. Последнее объясняется тем, что в настоящее время психофармакология уделяет приоритетное внимание безопасности лечения и подчеркивает важность сравнения клинической эффективности (пользы от лечения) с нежелательными явлениями, побочными эффектами и переносимостью (рисками лечения) [8].

При выборе транквилизаторов для клинического применения следует учитывать различия в спектре их действия. Исследования, которые проводятся в доклинических условиях, позволяют оценить скорость и степень всасывания лекарственных соединений из места введения, проникновение через гистогематические барьеры и доставку к месту действия. Доклиническое исследование позволяет оценить скорость и степень всасывания лекарственного вещества с целью оценки его скорости или степени всасывания на месте введения (в зависимости от вида фармакологической активности) и вывести их из организма вместе с продуктами превращения лекарства.

Пептиды — это короткие цепочки аминокислот, которые могут выполнять различные функции в организме, включая регуляцию нервной системы. Исследования пептидов как потенциальных анксиолитиков получили значительное внимание учёных. Известно, что определенные пептиды могут взаимодействовать с нейропептидными рецепторами в центральной нервной системе и оказывать влияние на нейротрансмиттеры, связанные с тревожностью и настроением.

Пептиды могут взаимодействовать с рецепторами ГАМК и серотонина, оказывая анксиолитическое действие. Они могут снижать уровень тревожности, улучшать настроение и обладать противовоспалительными

свойствами, что делает их потенциально полезными в лечении тревожных расстройств.

Разработка пептидных анксиолитических препаратов из продуктов пчеловодства может иметь ряд преимуществ.

Во-первых, пептиды являются более маленькими и легкими молекулами, чем белки, что облегчает их усвояемость организмом.

Во-вторых, продукты пчеловодства широко доступны и имеют низкую токсичность, что делает их привлекательными для использования в медицине.

Пептиды обладают потенциальными анксиолитическими свойствами и могут представлять альтернативу традиционным лекарственным препаратам. Однако, необходимы дополнительные исследования для подтверждения их эффективности и безопасности перед тем, как они могут быть широко применены в клинической практике.

Все вышесказанное позволило сформулировать цель, задачи исследования.

Цель работы: изучить основные механизмы действия анксиолитических препаратов, этапы доклинических исследований анксиолитических препаратов и оценить наличие анксиолитического эффекта пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа.

Для реализации поставленной цели поставлены следующие **задачи**:

1. Выделить и очистить пептидные фракции трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа с применением методов: тангенциальной ультрафильтрацией, ионообменной хроматографией, гель-фильтрацией;
2. Оценить поведение лабораторных животных в тесте «Открытое поле»: горизонтальную и вертикальную двигательную активность, обследование отверстий, фризинг, груминг, уровень дефекаций;

3. Оценить поведение лабораторных животных в тесте «Темная/светлая камера»: количество выходов в светлый отсек, латентное время выхода из тёмного отсека, суммарная длительность выглядываний, продолжительность 1 выхода в освещённую часть;
4. Провести статистическую обработку результатов, оценить наличие анксиолитической активности фракции трутневого расплода молекулярной массой 5-10 кДа.

Выпускная квалификационная работа написана на 69 листах, содержит 23 рисунка, 1 таблицу и список литературы на английском и русском языках из 41 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Молекулярные аспекты развития тревоги

Тревожные расстройства являются одними из самых распространенных психических заболеваний, которые влияют на качество жизни миллионов людей по всему миру. В последние годы было обнаружено, что механизмы развития тревоги на молекулярном уровне довольно сложны и включают в себя множество биохимических и нейрофизиологических процессов. Однако, развитие анксиолитических препаратов, которые способны уменьшить тревожность и улучшить качество жизни пациентов, значительно облегчило лечение этого расстройства.

Тревога является естественным адаптационным механизмом, сигнализируя о возможных угрожающих изменениях во внешнем мире или в самом организме [25].

В современной литературе для описания состояния тревоги используется два основных термина – собственно «тревога» и «тревожность». Хотя многие авторы используют эти термины как синонимы, однако в ряде исследований подчеркивается, что эти два понятия, хотя и связаны между собой, но они несут в себе разную смысловую нагрузку [17].

Под тревогой понимают негативное эмоциональное состояние, характеризующееся ожиданием неблагоприятного исхода текущей ситуации [3]. В ряде работ тревога описывается, как предрасположенность индивида переживать неопределенность, недостаточную информированность об условиях среды как ситуацию, сопряженную с возможной опасностью [39].

Возникновение любой эмоции базируется на активации различных групп биологически активных веществ и их сложном взаимодействии. Эта активация проявляется через вегетативные и нейроэндокринные реакции, психомоторным возбуждением и специфическими поведенческими паттернами. Нейрофизиологические и нейрохимические механизмы тревоги в настоящее время хорошо изучены.

Было установлено, что тревожность связана с активностью структур лимбической системы.

Лимбическая система представляет собой филогенетически более древнюю часть переднего мозга и включает в себя различные корковые подкорковые структуры. Корковые структуры включают: гиппокамп, парагиппокампальную извилину, поясную извилину, обонятельные луковицы и бугорки, орбитофронтальную, островковую и частично височную кору. Подкорковые структуры включают: миндалину, септальные ядра, переднее ядро таламуса, преоптическую область, гипоталамус, мамиллярные тела [4].

Необходимо отметить, что амигдаллярный комплекс играет ключевую роль в формировании состояния тревоги [40]. Активность ядер амигдаллярного комплекса контролируется корой, в частности, префронтальной (ПФК).

В качестве возможных нейрохимических механизмов, отвечающих за тревожность, упоминается активность различных нейромедиаторных систем. Несколько исследований указывает роль серотониновой системы в возникновении тревожных расстройств. Конкретно было выявлено, что изменения активности гена, кодирующего белок-транспортёр серотонина, положительно связаны с уровнем тревожности [32]. Так же имеются данные, указывающие на участие дофамина в формировании состояния тревоги. Исследования показали, что снижение уровня дофамина приводит к повышению уровня тревожности у крыс [17]. Кроме того, было обнаружено взаимосвязь между связывающей способностью дофаминовых рецепторов D2-типа ПФК и активностью амигдаллярного комплекса и других структур лимбической системы у испытуемых при просмотре изображений негативной валентности [18]. В процессе разработки теории ГАМК-бензодиазепа, возникновение избыточной тревожной реакции объясняется уменьшением активности ГАМК-ергических рецепторов [11].

Более того, в экспериментах на животных было обнаружено, что подавление ГАМК-ергической регуляции приводит к снижению ингибиторного влияния на нейроны базолатерального отдела миндалины, что в свою очередь вызывает их гиперактивацию, приводит к развитию тревожного состояния [37]. Несколько исследователей отмечают важность катехоламинергического компонента в процессе возникновения тревоги. Хорошо известно, что голубое пятно, расположенное в стволе мозга и содержащее значительное количество норадренергических нейронов, обладает обширными проекциями на различные области мозга. В 2017 году научная группа McCall смогла продемонстрировать активацию базолатерального отдела миндалины при стимуляции норадренергических волокон голубого пятна [30].

Таким образом, было установлено, что в условиях стрессовой ситуации, способствующей повышению уровня ситуативной тревожности, норадренергические волокна голубого пятна активируют базолатеральный отдел миндалины путём взаимодействия с β -адренорецепторами. Кроме того, стимуляция нейронов голубого пятна в состоянии тревоги приводит к активации симпатoadреналовой системы [19].

При изучении роли гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в возникновении тревоги важно отметить, что повышенный уровень кортизола оказывает влияние на синтез серотонина и норадреналина, что приводит к их дефициту и создаёт условия для развития расстройств тревожного спектра.

В основе нейрохимических механизмов эмоциональных состояний, включая тревожность, лежит реорганизация метаболизма нейронов, которые являются частью эмоциогенных зон мозга.

Это реорганизация определяет формирование отрицательного эмоционального состояния и запускает целый комплекс соматовегетативных проявлений эмоциональных реакций [26].

Таким образом, взаимодействие между структурами лимбической системы, активность нейромедиаторов и активация гипоталамо-гипофизарной системы, связанные с тревожными состояниями, проявляется в виде изменений биоэлектрической активности мозга и вегетативной и гуморальной регуляции деятельности человека.

1.2 Анксиолитические препараты и их классификация

Анксиолитики от лат. *anxietas* — это тревога + греч. *lytikos* — способный растворять, ослаблять, или транквилизаторы от лат. *tranquillo* — успокаивать, или атарактикиот греч. *ataraxia* — спокойствие, или психолептики — седативные средства, т.е психотропные вещества.

Анксиолитики проявляют способность снижать интенсивность тревожных состояний, страха, беспокойства, эмоционального напряжения, действуя на организм путём подавления или снижения его активности. При использовании данных препаратов существует возможность возникновения как психологической, так и физической зависимости [2].

Их можно классифицировать по различным критериям, включая: химическую структуру, механизм действия, фармакокинетические и фармакодинамические характеристики. Исторически можно выделить три поколения противотревожных препаратов:

1. Анксиолитики первого поколения, такие как диазепам, ксанакс, ативан и др.;
2. Анксиолитики второго поколения:
 1. Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС): лексапро, золофт и др.
 2. Ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (ИОСН): венлафаксин, дулоксетин
 3. Агонисты рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК): прегабалин, габапентин
 4. Некоторые другие анксиолитики: вистарил, атаракс.

3. Анксиолитики третьего поколения, включает такие препараты, как буспирон и др.

В клинической практике выделяют две группы транквилизаторов: ночные (снотворные) и дневные.

- Ночные транквилизаторы, также известны как классические, оказывают основное воздействие на снятие страха, тревоги и обладают снотворным эффектом. Примеры таких препаратов включают феназепам, диазепам, клоназепам и нитразепам.
- Дневные транквилизаторы обладают психостимулирующим действием. Они способны усиливать мозговую активность. Примеры дневных транквилизаторов: транксен, мексидол, клобазам.

Эти препараты могут назначаться амбулаторно в дневное время.

Согласно классификации М.Д. Машковского (1983), анксиолитики представлены несколькими классами химических соединений:

- производные бензодиазепина (бензодиазепины);
- карбаминовые эфиры замещенного пропандиола (мепробамат);
- производные дифенилметана (бенактизин, гидроксизин);
- транквилизаторы разных химических групп (бензоклидин, буспирон, мебикар и др.) [13].

По классификации Д.А. Харкевича (2015), транквилизаторы можно разделить на следующие группы в соответствии с их механизмом действия:

- агонисты бензодиазепиновых рецепторов (диазепам, феназепам и др.);
- агонисты серотониновых рецепторов (буспирон);
- вещества разного типа действия (бенактизин и др.) [24].

Наиболее полная классификация транквилизаторов по механизму действия разработана Т. А. Ворониным и С. Б. Середениным в НИИ фармакологии РАМН [5]. Данная классификация представлена в табл. 1.

Таблица 1 — Классификация важнейших транквилизаторов (по [5])

Механизм действия	Представители
Традиционные анксиолитики	
Прямые агонисты ГАМК _A -бензодиазепинового рецепторного комплекса (ГАМК — γ аминomásляная кислота)	Производные бензодиазепина: <ul style="list-style-type: none"> • с собственно анксиолитическим действием (хлордиазепоксид, диазепам) • с снотворным действием (нитразепам, флунитразепам) • с противосудорожным действием (клоназепам)
Препараты разного механизма действия	Препараты разного строения — мебикар, мепробамат, оксипидин и др.
Новые анксиолитики	
Частичные агонисты бензодиазепинового рецептора (БДР)	<ul style="list-style-type: none"> • имидазопиридины (алпидем, золпидем) • имидазобензодиазепины (имидазенил, бретазенил), дивалон, гизазепам
Эндогенные регуляторы (модуляторы) ГАМК _A -бензодиазепинового рецепторного комплекса	Фрагменты эндозепинов (в частности DBI — Diazepambindinginhibitor, т. е. ингибитора связывания диазепама), производные β -карболина (амбокарб,карбацетам)

Продолжение таблицы 1

Агонисты ГАМК _B - рецепторного комплекса	Фенибут
Мембранные модуляторы ГАМК _A -бензодиазепинового рецепторного комплекса	Мексидол, афобазол, ладастен
Глутаматергические анксиолитики	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты NMD_A-рецепторов (кетамин, фенциклидин) • Антагонисты AMP_A-рецептора (ифенпродил) • Лиганды глицинового участка (7-хлоркинуреновая кислота)
Серотонинергические анксиолитики	<ul style="list-style-type: none"> • Агонисты и частичные агонисты серотониновых 1_A-рецепторов (буспирон, гепирон, ипсапирон) • Антагонисты 1_C-, 1_D-рецепторов, 2_A-, 2_B-, 2_C-рецепторов (ритансерин, алтансерин) • Серотониновых 3_A-рецепторов (закоприд, ондансетрон)

Как показано в таблице 1, транквилизирующий эффект наблюдается не только у "классических" анксиолитиков, но и у препаратов, относящихся к различным клинико-фармакологическим группам, благодаря их воздействию на различные нейромедиаторные системы, участвующие в патогенезе тревоги.

Например, аминалон, который относят к ноотропным и цереброваскулярным препаратам (иногда к ноотропным анксиолитикам), обладает транквилизирующим эффектом. Баклофен, препарат с

миорелаксирующим, антиспастическим и анальгезирующим действием, также проявляет транквилизирующие свойства. Другими примерами являются ондансетрон (зофран), противорвотный препарат, и мексидол, антиоксидант. Также кетамин (калипсол), используемый в наркозной практике, обладает транквилизирующим действием. В настоящее время многие из этих препаратов не используются специально для лечения тревожно-фобических состояний. Фенциклидин является структурным аналогом кетамина со схожим механизмом действия (антагонизм глутаматных NMDA-рецепторов), но обладает галлюциногенными эффектами и не используется в клинической медицине в качестве лекарственного препарата.

Следует также отметить, что многие описанные авторами препараты, находящиеся на различных стадиях разработки и клинического применения, в данной таблице не рассматриваются.

Согласно особенностям клинического действия, бензодиазепиновые анксиолитики можно разделить на 3 группы:

- Бензодиазепины с преобладанием анксиолитического действия. Эти препараты оказывают основное воздействие на снижение тревоги и тревожных симптомов. Они используются в лечении тревожных состояний и панических расстройств;
- Бензодиазепины с преобладанием снотворного действия. Эта группа препаратов обладает сильным снотворным эффектом и широко применяется для лечения бессонницы. Они помогают улучшить качество сна и снизить время засыпания;
- Бензодиазепины с преобладанием противосудорожного действия. Эти препараты широко используются в лечении эпилепсии и приступов судорог. Они обладают антиконвульсантами свойствами и помогают предотвратить возникновение и развитие судорожных проявлений.

Такое деление бензодиазепиновых анксиолитиков на три группы основано на их основных терапевтических эффектах и помогает оптимизировать выбор препарата в зависимости от конкретных клинических потребностей пациента.

С точки зрения фармакологического действия, транквилизаторы могут быть разделены на следующие группы:

- Короткодействующие транквилизаторы - препараты, которые быстро метаболизируются и выводятся из организма, обладая кратковременным действием. Они широко используются для облегчения симптомов тревоги и панических атак в течение нескольких часов (алпразолам (ксанакс) и лоразепам (ативан)).
- Среднедлительные транквилизаторы - препараты, которые обладают длительным действием в организме. Длительность которого может составлять от нескольких часов до нескольких дней. Они часто используются для лечения хронических тревожных состояний (диазепам (валум), клоназепам (клонопин) и оксазепам (серакс)).
- Ультракороткодействующие транквилизаторы - новое поколение транквилизаторов, которые быстро воздействуют на организм и быстро выводятся из него. Они применяются для лечения панических атак и тревожных состояний, требующих немедленного облегчения (этизолам (эрилан), триазолам (халсион) и др).

1.3 Молекулярные механизмы действия анксиолитиков

Задачу передачи информации от одного нейрона к другому и переноса ее через синапс, главную роль, по сути, выполняют химические посредники – медиаторы (от лат. mediator - посредник). Согласно биологической теории депрессии, стресс вызывает снижение концентрации определенных медиаторов в синапсах.

В биохимических процессах нашего мозга вовлечено большое количество медиаторов, создающих сложную сеть взаимодействий. На

сегодняшний день выявлено 30 различных медиаторов, три из которых напрямую связаны с депрессией и стрессом. Это – норадреналин, серотонин и дофамин, которые относятся к классу биогенных аминов. Антидепрессанты улучшают мозговые механизмы, ответственные за депрессию, путем регулирования концентрации одного или нескольких биогенных аминов.

Механизм действия анксиолитиков связан с их способностью снижать возбудимость подкорковых областей мозга, которые отвечают за регуляцию эмоциональных реакций. К таким областям относятся: лимбическая система, таламус и гипоталамус. Анксиолитики оказывают влияние на рецепторы в этих областях, что приводит к уменьшению нервной активности и снижению выраженности эмоциональных ответов. Этот механизм позволяет смягчить чувство тревоги и напряжения, что является основным эффектом анксиолитического действия данных препаратов.

Согласно классификации Д.А. Харкевича, транквилизаторы можно разделить на следующие группы по механизму действия:

- Агонисты бензодиазепиновых рецепторов (диазепам, феназепам и др.);
- Агонисты серотониновых рецепторов (буспирон);
- Вещества разного типа действия (бенактизин и др.).

В данный момент хорошо изучен механизм действия производных бензодиазепа.

В мозге были обнаружены "бензодиазепиновые" рецепторы, которые тесно связаны с рецепторами γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). ГАМК является важным тормозным нейротрансмиттером, который реализует свои функции, открывая хлоридные ионные каналы в мембранах клеток нейронов. Возбуждение бензодиазепиновых рецепторов активирует ГАМК_A-рецепторы. Это приводит к увеличению частоты открытия хлоридных ионных каналов, а так же к возникновению гиперполяризации мембраны и снижению нейрональной активности. Бензодиазепины потенцируют ГАМК-ергическое торможение на всех уровнях ЦНС, включая структуры мозга, отвечающие за

эмоции (лимбическая система, гипоталамус, ядра таламуса), а также в спинной мозг. Существует несколько подтипов бензодиазепиновых рецепторов, присутствующих на мембранах нейронов в этих структурах мозга (Рис. 1).

Бензодиазепины являются липофильными соединениями, что облегчает их проникновение через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и другие биологические барьеры. Они хорошо всасываются из желудочно-кишечного тракта.

Большинство транквилизаторов подвергаются метаболической деградации (окислению) в печени с образованием активных метаболитов. Один из таких метаболитов, общий для многих бензодиазепинов, называется N-дезметил-дiazepam. Он циркулирует в организме более 65 часов. Образование этого метаболита, особенно при многократном применении препарата, приводит к накоплению лекарственного вещества, продолжительному действию и задержке эффекта после приема препарата.

Некоторые транквилизаторы, такие как мидазолам, производят неактивные метаболиты в виде конъюгатов. Эти препараты действуют в течение короткого времени и не вызывают побочных эффектов.

Бензодиазепины и их метаболиты могут связываться с белками плазмы (70–90%) и могут накапливаться в жировой ткани. Неизмененные препараты, их метаболиты и конъюгаты выводятся в основном почками, частично — кишечником.

Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина SSRI— это класс лекарственных препаратов, включающий такие препараты, как флуоксетин и сертралин. Они применяются для лечения различных психических расстройств.

Механизм действия SSRI заключается в блокировке обратного захвата серотонина в нервных клетках, что приводит к повышению уровня серотонина в мозге.

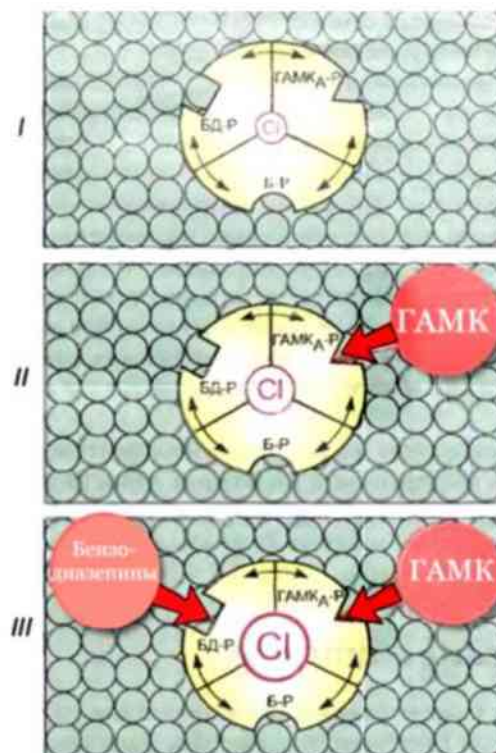


Рисунок 1. Механизм действия бензодиазепинов. Условная схема ГАМК_A-бензодиазепин рецепторного комплекса с ионофором хлора. I – состояние покоя; II – повышение проводимости хлорных каналов под влиянием ГАМК. Бензодиазепины (III) аллостерически усиливают действие ГАМК; БД-Р – бензодиазепиновый рецептор; Б-Р – барбитуратный рецептор

Это может улучшить настроение и снизить уровень тревоги. В отличие от бензодиазепинов, SSRI обладают более медленным началом действия. Однако они не вызывают зависимости и могут использоваться для длительного лечения пациентов.

Процесс обратного захвата серотонина в окончаниях нейронов осуществляется через специфический транспортер, который экспрессируется на этих окончаниях. Транспортер серотонина является членом семейства генов, кодирующих нейромедиаторные транспортеры.

Были идентифицированы транспортеры для серотонина, норэпинефрина, дофамина, глицина и ГАМК. Полная структура этих транспортеров включает белки с 12 мембранными доменами, содержащими

N-гликолизированные сайты, которые, вероятно, имеют значение для функционирования транспортера. Существует сходство между этими транспортерами и транспортерами для питательных веществ, таких как глюкоза.

Экспрессия серотонинового транспортера происходит преимущественно в серотониновых нервах. Специфичность экспрессии этого транспортера в нервных клетках и его селективность в перемещении серотонина через клеточные мембраны являются важными для их функционирования. Следует отметить, что серотониновый транспортер, а также транспортеры для норэпинефрина и дофамина, существенно отличаются от везикулярных моноаминовых транспортеров, которые концентрируют нейромедиаторы, такие как норэпинефрин, в синаптических везикулах. Везикулярные моноаминовые транспортеры могут быть ингибированы резерпином.

Серотониновые транспортеры относятся к классу Na^+/Cl^- -связанных транспортеров.

Высокая экспрессия этого транспортера и обширные исследования в области создания лекарственных средств, нацеленных на серотонинергические нейроны, привели к открытию и разработке нового класса лекарств, с высокой селективностью для ингибирования обратного захвата серотонина в нейронах и с минимальным влиянием на обратный захват других нейромедиаторов или другие связанные лекарственные мишени. Эти ингибиторы обратного захвата серотонина (SSRI) оказывают эффективное действие в лечении депрессии. Некоторые из этих препаратов также оказывают влияние на обратный захват норэпинефрина (НЭ). На некоторых животных моделях было показано, что SSRI могут изменять экспрессию 3-адренорецепторов и подтипов серотониновых рецепторов в головном мозге. Клиническое значение различий между SSRI в терминах длительности действия, специфичности и влияния на экспрессию рецепторов пока остается неизвестным и требует дальнейших исследований.

Анксиолитические препараты, применяемые для лечения тревожных расстройств, являются агонистами серотониновых рецепторов, включая буспирон, которые представляют собой сравнительно новый класс фармакологических средств. Они оказывают своё терапевтическое воздействие путем взаимодействия с рецепторами серотонина, что приводит к снижению симптомов тревоги.

Особое внимание в исследованиях уделено агонистам 5-HT_{1A}-рецепторов, которые являются одним из подтипов серотониновых рецепторов, поскольку они проявили свою высокую эффективность в контексте лечения тревожных расстройств.

Механизм действия этих агонистов заключается в снижении активности симпатической нервной системы, повышении активности парасимпатической нервной системы, уменьшении выделения кортизола (гормона стресса) и увеличении уровня гамма-аминомасляной кислоты (GABA) в нейронах.

Гамма-аминомасляная кислота (GABA) - представляет собой ингибиторный нейромедиатор, который способен снижать активность нейронов в центральной нервной системе. При использовании агонистов 5-HT_{1A}-рецепторов наблюдается увеличение уровня GABA, что способствует снижению симптомов тревоги.

Кроме того, агонисты серотониновых рецепторов могут уменьшать чувствительность к стимулам, вызывающим тревогу, и способствовать повышению настроения.

Тем не менее, механизм действия агонистов серотониновых рецепторов в качестве анксиолитиков до сих пор не полностью изучен, и не все пациенты, страдающие тревожными расстройствами, могут достичь положительного результата от их применения. Поэтому выбор лечения должен быть индивидуальным и основываться на учете конкретных симптомов и особенностей каждого пациента с участием врача.

Антагонисты бета-адренорецепторов, такие как пропранолол, используются для лечения физических симптомов тревоги, таких как учащенное сердцебиение и повышенное кровяное давление. Они работают, блокируя действие адреналина и норадреналина, которые являются нейромедиаторами, вызывающими физиологическую реакцию на стресс. Это может уменьшить физические симптомы тревоги и помочь пациентам чувствовать себя более комфортно в стрессовых ситуациях [12].

Механизмы действия каждого из указанных классов анксиолитиков различаются и в нашем организме работают по-разному. Различные анксиолитические препараты могут быть более эффективными, в зависимости от типа тревоги и особенностей пациента.

1.4 Доклинические исследования анксиолитических препаратов

Доклинические исследования с использованием животных для изучения потенциала терапевтического препарата или стратегии являются важными шагами перед переводом в клинические испытания [34].

Оценка безопасности новых анксиолитических препаратов является важным шагом в доклинических исследованиях. Для оценки безопасности применяются разнообразные методы и протоколы, включающие токсикологические исследования и оценку побочных эффектов.

Документы, регламентирующие проведение доклинических исследований: «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией Миронова А.Н. и Лекарственные средства для медицинского применения – Доклинические токсикологические и фармакокинетические исследования безопасности (ГОСТ 56702 2015)».

Оценка безопасности лекарственных препаратов на доклинической стадии направлена на выявление потенциальных органов-мишеней для токсичности и оценку обратимости данной токсичности.

Токсикологические исследования проводятся с целью определения потенциальной токсичности нового препарата и установления безопасной дозы для человека. Для этого проводятся исследования на животных, в том числе оценка токсичности при однократном и многократном введении препарата, оценка его тератогенности, мутагенности и канцерогенности [38].

При проведении доклинических исследований необходимо проводить оценку побочных эффектов нового препарата. Для достижения этой цели применяются различные методы, включающие анализ изменений в поведении и физиологии животных, а также анализ крови и других биологических жидкостей.

При проведении как доклинических, так и клинических исследований соблюдение этических принципов и стандартов является неотъемлемой частью процесса. Это включает заботу о животных и уважение прав пациентов.

Для продолжения клинических исследований необходимо иметь информацию о дозировке и уровнях токсичности препарата. Это важно для обеспечения безопасности участников исследований. Данные по фармакокинетике (как лекарство воздействует на организм и как организм обрабатывает лекарство) и фармакодинамике (как лекарство воздействует на организм и какие изменения происходят в организме в ответ на лекарство) также необходимы для правильного понимания действия препарата и определения оптимальной дозировки [31].

Токсикологические исследования играют важную роль в определении уровней токсичности препарата и его потенциальной опасности для здоровья человека. Полученные данные являются существенными для принятия решения о дальнейшем проведении клинических исследований.

Фармакокинетика — это область фармакологии, которая изучает, как организм взаимодействует с лекарственным препаратом после его введения. Фармакокинетические исследования направлены на изучение обработки лекарственных средств организмом. Эффективность лекарственного

препарата зависит от того, сколько активного вещества попадает в организм и в каком месте его действие требуется. Абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция лекарства влияют на его концентрацию в кровотоке и, следовательно, на его биодоступность.

Анксиолитические препараты представляют собой категорию фармакологических средств, которые могут вводиться в организм разными способами в зависимости от их формы выпуска и свойств.

Наиболее распространенный способ введения анксиолитических препаратов, перорально. Препараты выпускаются в виде капсул, таблеток, жидкостей или порошков, которые могут быть легко проглочены.

Этот способ введения является наиболее удобным для большинства пациентов и может быть применен как для краткосрочного, так и для длительного лечения.

При пероральном приеме препарата рекомендуется соблюдать интервалы между приемами, составляющие 4–6 часов, в то время при внутримышечном введении следует учитывать, что интервал между инъекциями не должен быть менее 2 часов. Некоторые руководства допускают одномоментное введение дозы, превышающей рекомендованную разовую терапевтическую дозу [1].

Тем не менее, необходимо учесть, что, хотя пероральный прием является наиболее удобным, относительно безопасным и экономически эффективным методом, альтернативные пути введения могут обладать определенными преимуществами. Действительно, при назначении препарата для перорального приёма внутрь требуется активное участие пациента в соблюдении терапевтического режима (частота приема, дозировка препаратов и так далее). Кроме того, при данном способе введения величины абсорбции непостоянны и часто зависят от множества факторов.

Среди таких факторов можно выделить следующие: влияние пищи на процесс поглощения препарата; одновременное применение других лекарственных препаратов, которые могут усиливать перистальтику или

вызывать разрушение препарата в кишечнике; задержка препарата в пищеводе при его приёме в положении лежа и при малом потреблении жидкости. В итоге только часть препарата, принятого внутрь, проникает в порталную систему, а затем в системное кровообращение. Это замедляет начало действия и снижает эффективность препарата [20].

В качестве альтернативных форм чаще используется инъекционное введение. Это способ введения способствует относительно быстрому началу действия препарата (в среднем в течении 20–30 минут), особенно в случаях, когда требуется достижение быстрого эффекта.

Кроме того, позволяет создать депо препарата и избежать проблем, связанных с высокой начальной концентрацией препарата в плазме после его быстрого внутривенного введения [29].

В последние годы в практику внедряются новые способы введения, это прием через слизистую оболочку и трансдермальное введение.

Через слизистую оболочку, например, в виде спреев или капель. Этот способ введения может быть полезен для пациентов, у которых есть проблемы с глотанием таблеток.

Трансдермальное введение — это способ введения препарата через кожу. Препараты в форме пластырей могут содержать активные ингредиенты, которые могут проходить через кожу и поступать в кровь.

В этой системе действующий препарат заключен с полимерную матрицу, которая располагается в прилипающем к коже слое. За счет пассивной диффузии через верхние слои кожи активный компонент попадает в ток крови и доставляется к рецепторам мишеням. Технология пластыря-матрицы обеспечивает постоянное, медленное высвобождение препарата в системный кровоток. Такой способ введения удобен при длительном лечении, так как позволяет поддерживать стабильную концентрацию препарата в крови.

Как правило, способ введения анксиолитических препаратов зависит от многих факторов, включая состояние здоровья пациента, форму и дозировку препарата, наличие побочных эффектов и другие факторы.

В большинстве случаев лекарства принимаются перорально, после чего они проходят через желудочно-кишечный тракт и достигают целевых мест действия. В процессе пути к целевым местам лекарство проходит через печень, где происходит метаболизм первого прохождения. В результате концентрация лекарства в крови снижается перед его попаданием в системный кровоток. Внутривенное введение лекарства обходит этот этап и обеспечивает более высокую биодоступности.

После попадания в кровоток лекарство распределяется по различным тканям.

Так же для определения безопасности препаратов перед проведением клинических испытаний необходимо проводить доклинические токсикологические исследования.

Эти исследования позволяют определить схему лечения с наименьшей степенью токсичности и выбрать подходящую и безопасную начальную дозу для клинических испытаний. Доклинические исследования начинаются с оценки воздействия однократной дозы препарата на организм, а затем продолжаются с использованием подходов с повторными дозами для выявления органов, которые могут быть подвержены токсичности препарата [33].

Исследования, проводимые с использованием однократной дозы препарата, могут предоставить ценную информацию о влиянии дозы на токсичность препарата как на системном, так и на местном уровне. Полученные данные могут быть использованы для определения безопасных доз, которые можно применять в последующих исследованиях токсичности. Зависимость между дозой и реакцией может быть изучена как в ходе исследований токсичности при однократной дозе, так и в рамках

фармакологических исследований или исследований эффективности на животных моделях.

Все анксиолитические препараты проявляют разнообразные фармакологические эффекты. Анксиолитический эффект присущ всем препаратам данного класса, но особенно выражено у феназепама, диазепама, хлордиазепоксида, лоразепама, мепробамата и амизила.

Седативный эффект проявляется путём снижения избыточного возбуждения и подавления двигательной активности. Самым ярко выраженным седативным эффектом обладают: феназепам, диазепам и лоразепам, но его выраженность ограничена у мезапама и мидазолама.

Препараты, такие как диазепам и клоназепам, являются основными средствами, применяемыми в противосудорожной терапии.

Бензодиазепины обладают способностью снижать тонус скелетной мускулатуры. Умеренное мышечно-релаксантное действие бензодиазепинов является положительным свойством, поскольку они обычно оказывают снижение тревоги и устраняют нервное беспокойство, связанных с повышенным мышечным напряжением. Диазепам характеризуется выраженной миорелаксацией, в то время как у дневных транквилизаторов этот эффект проявляется слабо. Тем не менее, глубокая миорелаксация не всегда является желательной, поскольку может сопровождаться снижением инициативности, бдительности и способности принимать активные решения.

Снотворный эффект, который проявляется у некоторых препаратов, обусловлен их способностью быстро инициировать сон, удлинять его продолжительность и продлевать действие препаратов путём подавления центральной нервной системы. Наиболее известными снотворными являются нитразепам, диазепам и феназепам.

Транквилизаторы имеют способность усиливать и продлевать действие наркотических анальгетиков, наркозных и местных анестетиков, что делает их широко применяемыми в анестезиологической практике [22].

Для биофармацевтических препаратов с продолжительными фармакологическими или токсикологическими эффектами требуется продолжительное наблюдение за животными из группы восстановления до тех пор, пока не будет достигнута обратимость эффектов.

Длительность повторных исследований должна быть определена с учётом ожидаемой продолжительности клинического эффекта и от медицинских показаний. Обычно для большинства биофармацевтических препаратов продолжительность таких исследований составляет от 1 до 3 месяцев.

Для биофармацевтических препаратов, применяемых в лечении острых и краткосрочных заболеваний с продолжительностью терапии менее 7 дней, обычно достаточно проведения повторных исследований с длительностью до 2 недель для подтверждения клинической эффективности и получения разрешения на продажу.

Однако для биофармацевтических препаратов, предназначенных для хронических заболеваний, необходимо проводить исследования продолжительностью до 6 месяцев, чтобы получить достаточное количество данных для подтверждения их безопасности и эффективности. [35].

Для обеспечения безопасности биофармацевтических препаратов необходимо проводить исследования потенциальной нежелательной фармакологической активности на соответствующих моделях на животных.

При необходимости следует включить специальный мониторинг этих активностей в исследования токсичности и клинические исследования. А для оценки потенциальной токсичности препаратов используют функциональные показатели, которые могут быть исследованы в отдельных исследованиях или включены в план исследований токсичности [41].

В рамках исследования все животные проходят регулярные клинические обследования. По окончании исследования проводится детальное патологоанатомическое исследование всех животных. Однако, необходимо учитывать, что результаты доклинических исследований на

животных не всегда могут быть перенесены на человека, и проведение клинических испытаний на людях также необходимо для оценки эффективности и безопасности препарата.

В доклинических исследованиях анксиолитических препаратов на животных часто используют различные тесты, которые помогают оценить уровень тревоги и эффекты препарата на поведение животных. Согласно руководству для специфической оценки анксиолитических препаратов рекомендовано следующие тесты: «Открытое поле», «Тёмная/светлая камера».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования стали пептидные фракции трутневого расплода, с молекулярной массой 5-10 кДа. Выделение и очистка проводилась с использованием материально-технической базы кафедры «Общая биология и биохимия», с применением методов ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации.

Трутни – это особи мужского пола. Трутневый расплод представляет собой совокупность развивающихся особей, включая личинки, предкуколки и куколки, и обладает физико-химическими свойствами и качественным составом, схожими с маточным молочком. Содержание протеина, редуцирующих сахаров, макро- и микроэлементов в трутневом расплоде и маточном молочке идентично. Однако трутневый расплод отличается от маточного молочка по показателям содержания ненасыщенных кислот (по показателю окисляемости), pH, массовой доли воды. В трутневом расплоде содержание деценовых кислот ниже, но выявляются значительно более высокие уровни сульфгидрильных групп тестостерона, прогестерона и эстрадиола. Следует также отметить, что маточное молочко является довольно дорогостоящим продуктом.

Получение гомогената трутневого расплода экономически выгоден, поскольку стоимость этого дополнительного продукта пчеловодства превышает затраты на его производство [16].

Пептиды трутневого расплода являются биологически активными веществами, которые могут оказывать положительное воздействие на мозг и нервную систему. По существующим данным БАДы на основе трутневого расплода обладают анксиолитическим эффектом, то есть способны снижать уровень тревоги и страха у человека [27]. Преимуществом трутневого расплода по отношению к известным анксиолитическим препаратам является

проявление более мягкого действия, без серьезных побочных эффектов, таких как сонливость, нарушения координации движений и зависимость. Кроме того, трутневый расплод быстро подвергается метаболической деградации и выведению из системы организма. Эти факторы делают трутневый расплод более перспективным в качестве потенциального альтернативного средства для облегчения симптомов тревожных состояний.

С высокой долей вероятности, ключевая роль в формировании эффекта препаратов принадлежит пептидам. В связи с этим актуально является выделение этих пептидов из трутневого расплода и изучение их биологической активности.

В настоящее время проводятся исследования, чтобы установить, какие конкретно пептиды трутневого расплода могут иметь анксиолитические свойства и как они оказывают свое воздействие на нервную систему. Однако уже сейчас известно, что некоторые из этих пептидов могут влиять на работу нейротрансмиттеров, таких как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), серотонин и дофамин, которые играют важную роль в регуляции настроения, эмоций и поведения [17].

2.2 Приготовление раствора трутневого расплода, ультрафильтрация

В исследовании для получения пептидного препарата использовался трутневый расплод, собранный в 2022 г. Образцы были запечатаны в темные стеклянные ёмкости и хранились в морозильной камере. При каждом отборе проб оценивались внешний вид и запах, наличие посторонних примесей, включений обнаружено не было.

Для приготовления рабочего раствора 50 г трутневого расплода гомогенизировали в 0,1 л воды, сначала фильтровали через ватный фильтр для удаления крупных механических частиц, затем через фильтр с "красной лентой" на воронке Бюхнера с использованием вакуума.

Полученный раствор концентрировали для разделения на фракции, содержащие белки с массой 5-10 кДа. Для фильтрации этого раствора использовали специальную ультрафильтрационную систему MasterFlex с мембраной Vivaflow, при этом были выполнены следующие шаги:

1. Первичная промывка мембраны для удаления загрязнений и консервантов с использованием дистиллированной воды (0,5-1 объема исходного резервуара);
2. Промывка мембраны 0,5 Н раствором NaOH для удаления остаточных загрязнений (0,5-1 объема исходного резервуара);
3. Вторичная промывка мембраны равным объёмом дистиллированной воды для удаления остатков раствора щёлочи и оставшихся примесей.

Полученный концентрированный фильтрат хранился в плотно закрытой стеклянной емкости в морозильной камере для дальнейшего анализа. После фильтрации мембранный блок промывался так же, как и перед использованием.

В данном исследовании, принцип ультрафильтрации, используемый в установке Vivaflow, называется фильтрацией с тангенциальным потоком. Принципиальная схема установки показана на рисунке 2.

Исходный раствор из резервуара 1 под воздействием давления, создаваемого перистальтическим насосом 2, поступает в мембрану 3. Это давление разделяет частицы раствора. Молекулы с массой более 5 кДа (это значение зависит от параметров полупроницаемой мембранной установки), не проходят через мембрану и возвращаются в резервуар 1, а молекулы с меньшей массой проходят через мембрану и попадают в резервуар 4 [21].

Используя принцип тангенциального потока жидкости, мембрану можно многократно использовать для ультра- и нанофильтрации, разделяя вещества и очищая саму мембрану.

Это достигается за счёт того, что поток жидкости, создаваемый перистальтическим насосом, течёт вдоль поверхности мембраны со стороны

резервуара 1 и очищает молекулы, которые из-за своего размера не могут проникнуть в поры мембраны.

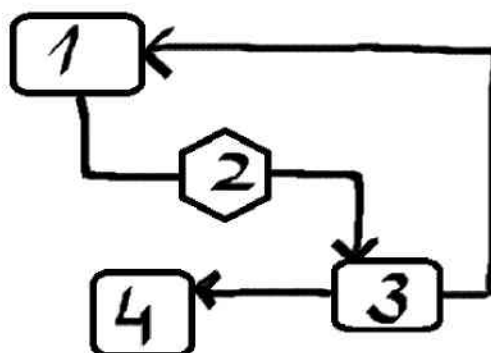


Рисунок 2. Схема ультрафильтрационной установки Vivaflow: 1 — резервуар 1, 2 — перистальтический насос, 3 — мембрана с определённой селективностью, 4 — резервуар 2

Сочетание процесса очистки и фильтрации мембраны, который осуществляется параллельно с методом тангенциального потока, позволяет концентрировать отфильтрованный раствор. Этот эффект концентрирования достигается путем постоянного, но небольшого оттока растворителя. Таким образом, потеря целевых частиц с массой, превышающей 5-10 кДа, минимальна, и достигается отток молекул растворителя.

2.2.1 Очистка пептидов раствора трутневого расплода от углеводов, их разделение ионообменной хроматографией

В качестве матрицы для ионообменной хроматографии использовали DEAE-целлюлозу. DEAE-целлюлоза представляет собой крупнопористый и слабый анионообменник, широко используемый для хроматографии белков и олигонуклеотидов. Исходно DEAE-целлюлоза представляет собой белый, сухой, мелкозернистый порошок, который требует последующего предварительного преформирования и промывки.

Преформирование является важной процедурой подготовки целлюлозных ионообменников, которые хранятся в сухом виде.

Это связано с тем, что при сухом хранении или сушке образуются дополнительные водородные связи между гранулами и целлюлозными нитями. Эти связи затрудняют эффективное развертывание ионогенных групп, что негативно сказывается на способности матрицы к сорбции разделяемых веществ. Таким образом, проведение преформирования позволяет устранить данные проблемы и обеспечить оптимальные условия для дальнейшей хроматографической сорбции.

Навеску массой 3 г залили большим количеством дистиллированной воды. Смесь оставили для набухания на 24 часа. Поскольку DEAE-целлюлоза имеет низкую степень набухания, поэтому не следует ожидать значительного увеличения объёма. После 24 часов набухания ионообменник следует несколько раз перемешать для осаждения гранул целлюлозы. Затем следует удалить не осевшие частицы, остатки гранул и другие примеси. Для этого используют процедуру декантации. Сначала надо налить свежей дистиллированной воды, дать отстояться и снова слить. Повторить эту процедуру надо не менее трех раз, пока вся видимая грязь не будет удалена с поверхности.

Преформирование DEAE-целлюлозы проводят следующим образом: набухшие гранулы перемешивают и дают им осесть на дно сосуда. Затем удаляют верхний слой жидкости, и смесь заливают 0,5 М раствором HCl на 45–60 минут для полной ионизации ионогенных групп. Затем ионообменник осторожно промывается до pH ~ 4 (либо на фильтре, либо путём нескольких циклов перемешивания–декантации и добавления воды).

Нет необходимости промывать до нейтральных значений, так как ионы OH^- постепенно замещают ионы Cl^- в ионогенных группах, что может привести к обратному подкислению раствора и значительному увеличению времени промывки.

Затем ионы Cl^- заменяются на ионы OH^- путём погружения в 0,5 М раствор NaOH на 45–60 минут.

Затем ионообменник снова промывается, но уже до достижения нейтрального значения pH, закисления или защелачивания промываемой воды происходить не будет.

При использовании DEAE-целлюлозы для ионообменной хроматографии необходимо выполнить следующую процедуру со стеклянной колонкой с диаметром 1,75 см и объемом носителя 6,5 мл:

1. На дно колонки помещается кружок фильтровальной бумаги. Это делается для того, чтобы сорбент не вытекал из колонки.
2. Предварительно взмученная DEAE-целлюлоза заливается в колонку постепенно, в несколько этапов. Это помогает избежать образования перепадов плотности сорбента. Каждый раз после заливки новой порции суспензии носителя, колонка осаждённых частиц перемешивалась для обеспечения равномерного распределения сорбента.
3. После достижения необходимого объёма сорбента столбик осевших частиц перемешивается в последний раз. После того как частицы осели, на поверхность сорбента накладывался кружок из фильтровальной бумаги. Это делается для предотвращения возможного колебания уровня осевших частиц во время внесения образца.

В результате выполнения этих шагов DEAE-целлюлоза равномерно распределилась в стеклянной колонке, обеспечивая эффективную ионообменную хроматографию.

После всех вышеописанных процедур колонка была уравновешана и промыта буфером, которая использовалась на первом этапе элюирования (0,2 М трис- HCl , pH = 9). Поскольку эквilibрация занимает много времени, в качестве исходного буфера использовали 10-кратный объём колонки.

После всей подготовки и уравнивания колонки хроматографическая процедура проводится с использованием двух различных буферов: 0,2 М трис-HCl (pH = 9) и 0,2 М Na-цитратный (pH = 6).

В процессе хроматографии собирали фракции с объёмом 2 мл; после сбора восьмой фракции буферный раствор заменяли. После сбора фракций колонку уравнивали исходным буфером, плотно закрывали пробкой для предотвращения подкисления CO₂ воздуха и угольной кислоты, образующейся из протонов буфера, и хранили в холодильной камере.

Содержание пептидов во фракциях определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 280$ нм, а содержание углеводов - реакцией Селиванова.

2.2.2 Спектрофотометрическое определение концентрации пептидов

Концентрация пептидов была определена спектрофотометрическим путём измерения поглощения при длине волны $\lambda = 280$ нм, используя тот факт, что триптофан и тирозин, ароматические аминокислоты, входящие в состав многих белков и пептидов, проявляют оптическое поглощение при различных длинах волн: 279 нм и 274 нм соответственно; вклад в общее поглощение фенилаланина сравнительно мал.

Для определения концентрации исследуемый раствор помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и измеряли оптическую абсорбцию при длине волны $\lambda = 280$ нм против контроля (чистый растворитель). Полученные значения использовались для построения профиля элюции пептидов после хроматографии. Также значения абсорбции использовались для определения концентрации методом калибровочной кривой в диапазоне концентраций от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл. В качестве стандарта белка использовался бычий сывороточный альбумин.

2.2.3 Концентрирование и очистка раствора пептидов от буферного раствора гель – фильтрацией

Для концентрирования раствора пептидов после ионообменной хроматографии был применен метод выпаривания.

После нескольких этапов ионообменной хроматографии, фракции, содержащие очищенные от углеводов пептиды, были объединены в один стеклянный стакан. Затем стакан был помещен в сухой воздушный термостат при температуре 40 °С до полного испарения раствора. После полученный сухой остаток растворяли в 1 мл дистиллированной воды.

Обессоливание раствора пептидов после ионообменной хроматографии проводилось с помощью гель–фильтрации. Этот метод основан на том, что молекулы разного размера и массы разделяются за счёт различий в подвижности через пористую колонку носителя в потоке элюента. В качестве носителя в данном исследовании использовался химически модифицированный декстран, известный как сефадекс, частицы которого имеют постоянный размер пор. Молекулы меньшего размера и массы проходят через гранулы, а также между гранулами, поскольку они элюируются через носитель вместе с подвижной фазой. В результате общий путь, пройденный этими молекулами, оказывается больше, чем у более крупных молекул, которые не проходят через в поры носителя.

Обессоливание проводили на колонке, заполненной сефадексом G-25 (диаметр колонки 7 мм, объём носителя — 14 мл). Носитель готовили следующим образом: 2 г сухого порошка сефадекса засыпали в дистиллированную воду и давали набухнуть на 4-5 часов, после чего проводили несколько циклов перемешивания и декантации для удаления неосевших частиц, фрагментов гранул и прочих примесей. Набухший чистый гель заливали в колонку с фильтровальной бумагой на дне для предотвращения потери геля.

Колонка заполнялась постоянным потоком элюента. Для предотвращения резких колебаний плотности носителя не позволяли всему гелю преждевременно осаждаться в колонке. При достижении желаемого объёма геля заполнение останавливали, уравнивали скорости притока и оттока элюента и промывали колонку в течение длительного периода времени для уравнивания. После уравнивания над колонкой с гелем помещали диск из фильтровальной бумаги для предотвращения колебаний уровня геля во время элюирования и внесения образца.

Образец наносили так, чтобы столбик элюента был настолько мал, что был едва заметен, до полного погружения в гель. Поверх геля осторожно добавили 1 мл концентрированного раствора, содержащего белки и пептиды, а также натриевую соль лимонной кислоты и саму кислоту. После того как образец диффузно впитался в гель, началась элюция с использованием дистиллированной воды, и фракции были собраны по 2 мл. По завершении элюции колонка промывалась в течение длительного времени и хранилась в холодильной камере.

Содержание пептидных молекул определяли спектрофотометрически, путём измерения поглощения при длине волны $\lambda = 280$, а содержание цитрат-ионов определяли путём осаждения хлоридом кальция.

2.3 Организация эксперимента на лабораторных животных

Исследование проводили на 24 самцах беспородных крыс в возрасте около 5-6 месяцев, массой 290–300 грамм в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственными средствами [14]. Животные содержались в стандартных условиях вивариях, при естественном освещении, относительной влажности воздуха 40–50% и температуре 22-24°C, на стандартном полнорационном диете для лабораторных животных ГОСТ Р 50258–92 [7].

Крысы были разделены на 4 группы (по 6 крыс в каждой группе). Животные из экспериментальной и контрольной группы были размещены в разных отсеках. Содержание животных и условия проведения экспериментов соответствовали ГОСТ 34088–2017 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» [6].

1. Животные (Контроль 1) интраназально получали 10 мкл 0,9%-ного раствора NaCl.
2. Животным (Контроль 2) внутривбрюшинно вводилось 1 мл 0,9%-ного раствора NaCl.
3. Животные из опытной группы (Опыт 1) интраназально получали 10 мкл раствора пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа из расчёта 100 мкг/кг массы тела.
4. Животным из опытной группы (Опыт 2) внутривбрюшинно вводились 1 мл раствора пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа из расчёта 500 мкг/кг массы тела.

Введение контрольным (0,9%-ного раствора NaCl) и опытным группам (пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа) интраназально и внутривбрюшинно осуществлялось 1 раз в сутки между 9:00 и 11:00 часами в течение 21 дня. Тесты проводились после итогового введения пептидных фракции трутневого расплода через 30 минут.

2.4 Методы изучения специфической анксиолитической активности

Согласно руководству проведения доклинических исследований существует несколько методов изучения специфической анксиолитической активности на моделях поведения, которые используются в современных исследованиях: «Открытое поле», «Тёмная/светлая камера». Они являются наиболее желательными при изучении нового препарата, которые расширяют представления о специфической анксиолитической активности.

2.4.1 Тест «Открытое поле»

Тест «Открытое поле» является одним из старейших классических методов. Данный метод был разработан К. Холлом и оценивает исследовательское поведение подопытного животного, а также его общую активность [9].

Оборудование имеет круглую форму, с шириной 500 мм, высотой 300 мм, которое расчерчено на квадраты (100 x 100 мм). Внутри камеры нарисованы круги, которые напоминают «норку» - каждый круг имеет углубление 2 см. Пол камеры равномерно разделен линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями. Предварительно крыс перед экспериментом в течение 3-х минут выдерживали в темноте, после чего помещали на один из квадратов периметра открытого поля при освещённости в помещении 300 люкс.

В течение 10 минут наблюдения регистрировали горизонтальную и вертикальную двигательную, поисковую активности, груминг, фризинг, дефекацию. Фиксировался число пересеченных квадратов на периферии и в центре (отдельно).

2.4.2 Тест «Тёмная/светлая камера»

Методика тёмной/светлой камеры основана на естественном инстинкте грызунов избегать сильно освещенных зон. Этот метод по идеологии близка с методикой приподнятого крестообразного лабиринта.

Для проведения теста используется камера, неравномерно разделенная на одну треть тёмной и две трети светлой части (возможны также модификации с другими соотношениями светлой и темной части).

Светлая и темная части камеры отделены друг от друга перегородкой с отверстием шириной менее 7 см для перехода между частями [28]. Светлая часть освещалась настольной лампой с яркостью 300 люкс, расположенной на высоте 25 см над отсеком.

В начале пятиминутного сеанса крыс помещали в переход и поворачивали головой в сторону темного отсека.

Регистрировались такие параметры, как: латентное время выхода на светлый участок, количество выглядываний, количество выходов, продолжительность одного выхода.

2.5 Статистическая обработка данных

Для всех количественных данных были рассчитаны средние арифметические значения по группам и стандартные отклонения. Обработку данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического U- критерия Манна-Уитни. Статистическая значимость различий выявлялась при использовании уровня значимости $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение пептидных фракций из раствора гомогената трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа, проводилось на базе кафедры «Общая биология и биохимия». Разделение раствора гомогената трутневого расплода проводилось в несколько этапов, основные этапы процесса представлены на рисунке 3.

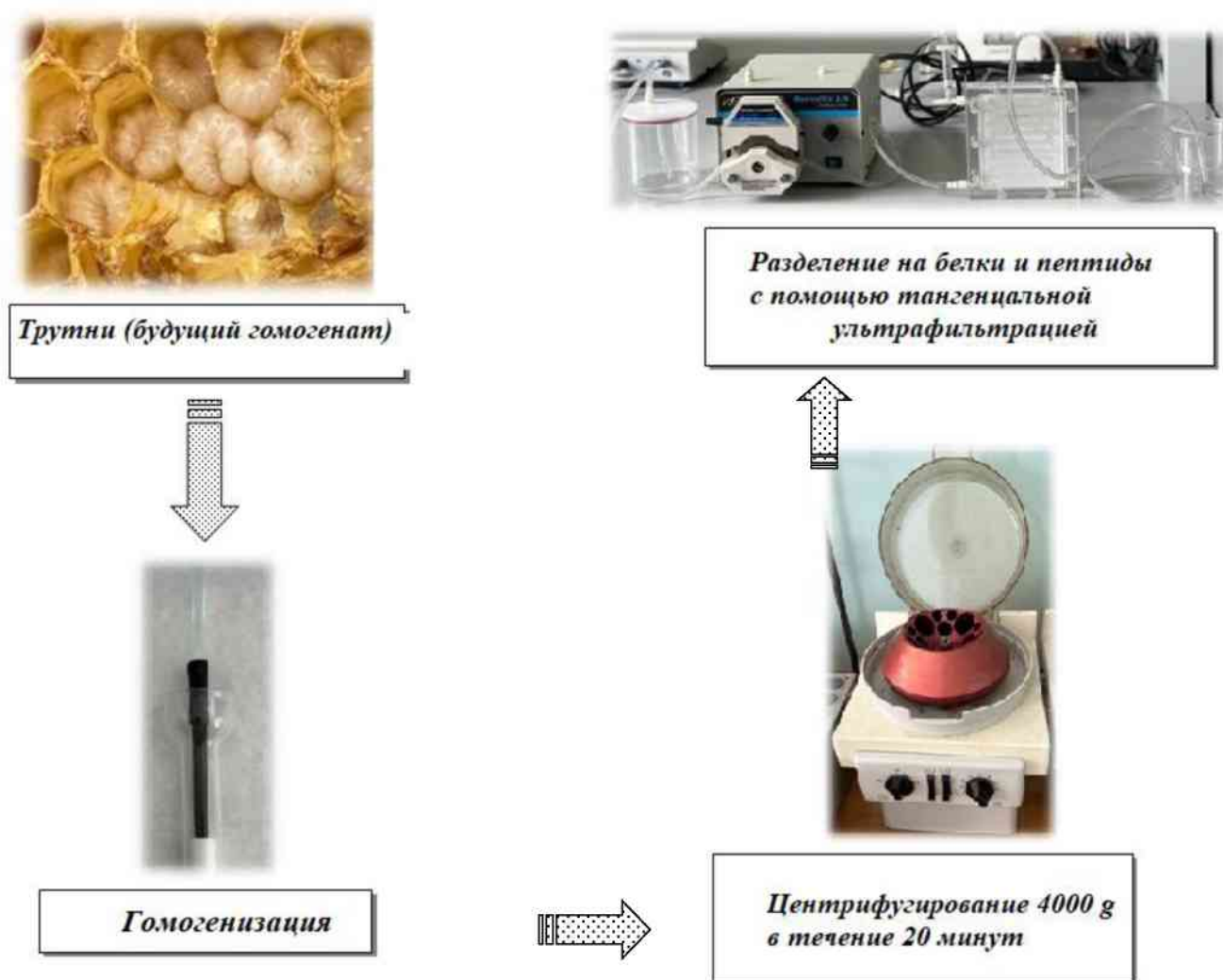


Рисунок 3. Общая схема выделения, очистки и разделения пептидного препарата

3.1 Очистка от углеводов и разделение белков и пептидов методом ионообменной хроматографии

Для проведения очистки белков и пептидов трутневого расплода от углеводов сначала был определен достаточный объём раствора трутневого расплода, который применялся для обеспечения оптимального выхода белкового продукта.

Для этой цели, без изменения параметров колонки, производилась хроматография с пробным объёмом 0,75, 0,5 и 0,35 мл. Профили элюции представлены на рисунках 4, 5, 6.

Экспериментально было подтверждено, что при применении объёма пробы в 0,75 мл очищенные белки и пептиды имеют недостаточно высокий выход для последующего анализа, в то же время количество нереагирующих с обменником белковых молекул оказываются высокими.

Было установлено, что оптимальный объём составляет 0,5 мл, при котором связанный белок и несвязанный пептид находятся в относительном равновесии. Использование объёма 0,35 мл нецелесообразно для дальнейшего анализа, так как выход белка слишком мал.

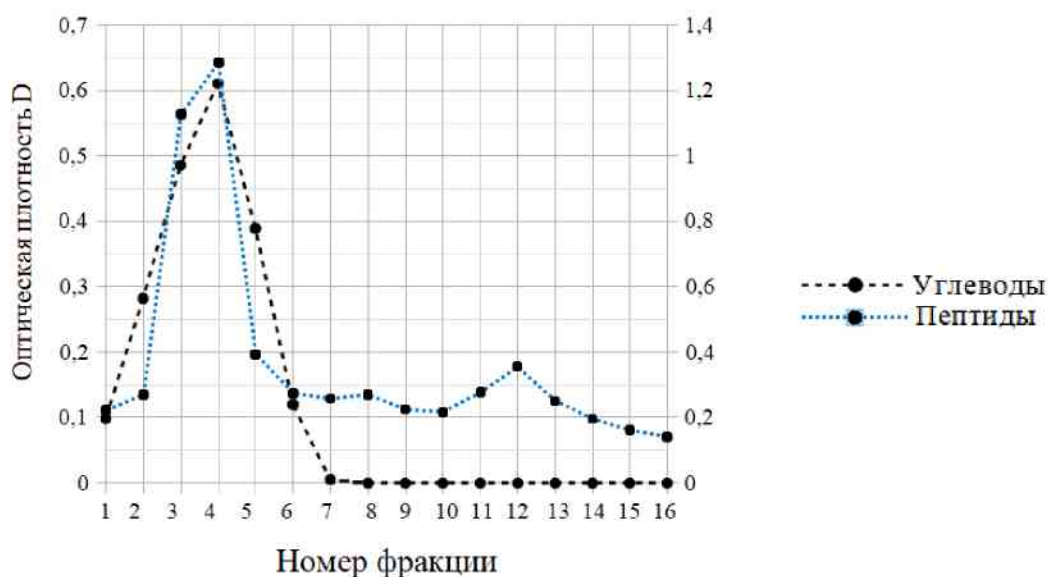


Рисунок 4. Профиль элюции пептидов и углеводов при объёме пробы 0,75 мл

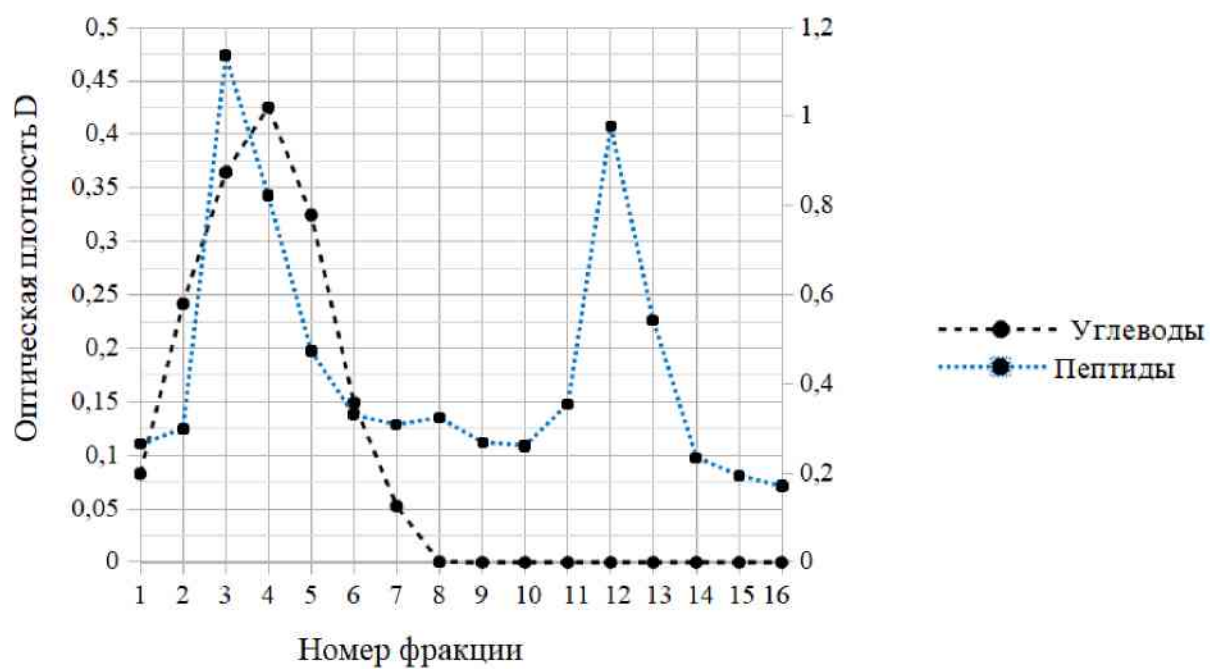


Рисунок 5. Профиль элюции пептидов и углеводов при объёме пробы 0,5 мл

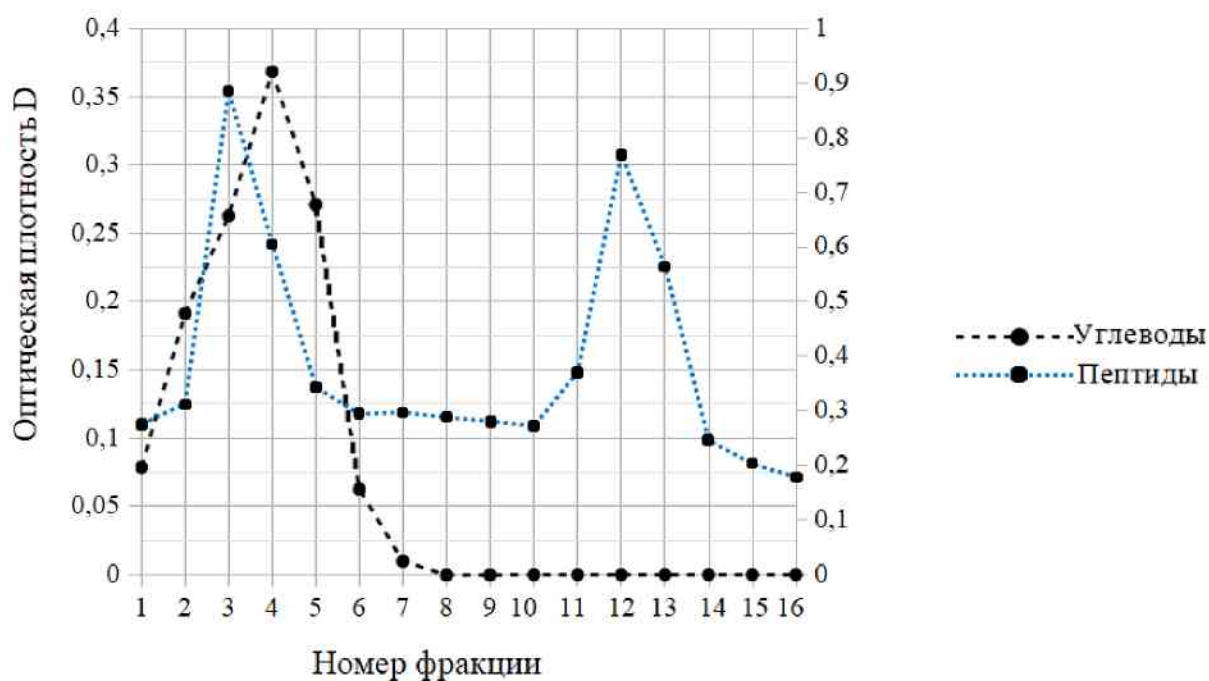


Рисунок 6. Профиль элюции пептидов и углеводов при объёме пробы 0,35 мл

Для количественной оценки выхода белков и пептидов трутневого расплода после очистки от углеводов методом ионообменной хроматографии концентрацию белка в каждой фракции рассчитывали по значениям оптической плотности с использованием калибровочной кривой. Профили элюции по концентрации показаны на рисунках 7, 8 и 9.

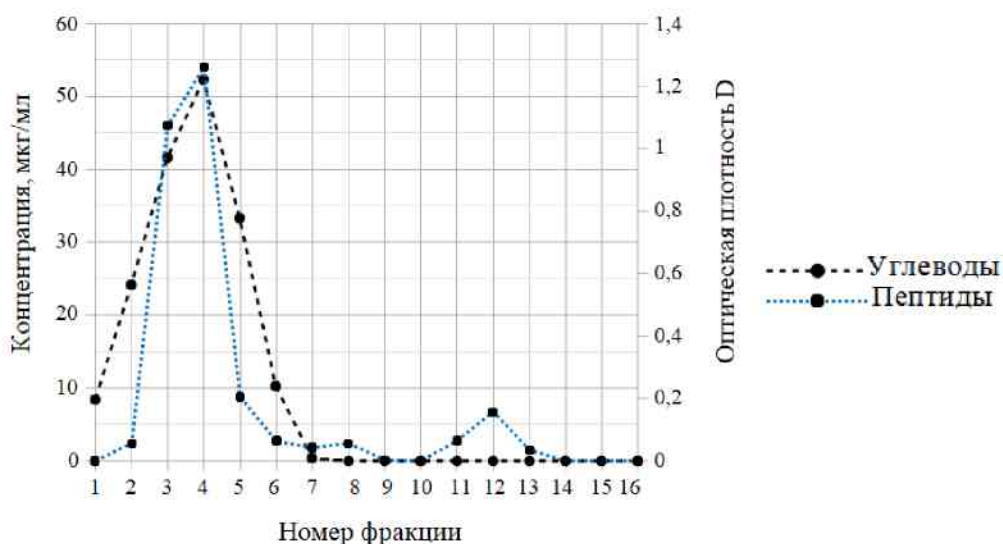


Рисунок 7. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,75 мл по концентрации белка

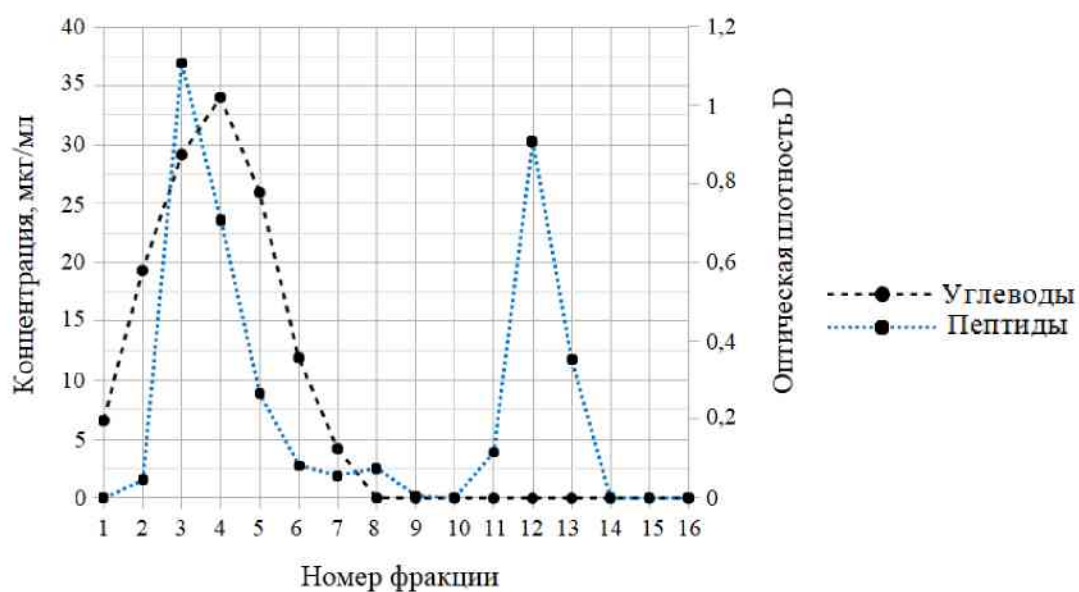


Рисунок 8. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,5 мл по концентрации белка

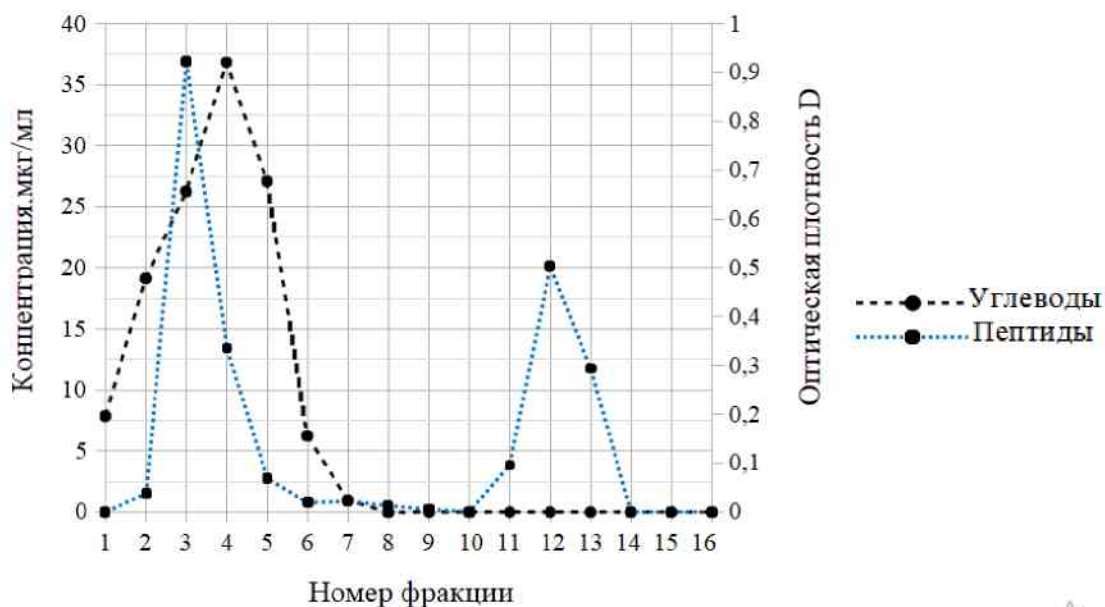


Рисунок 9. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,35 мл по концентрации белка

Выход пептидов после хроматографии определялся путем измерения оптической плотности с последующим расчетом концентрации. Концентрация рассчитывалась по калибровочным кривым, построенным на основе разведений БСА.

Последующая очистка пептидов от углеводов проводилась при постоянных параметрах хроматографической системы. А именно, с высотой ионообменной колонки 6,5 см и диаметром колонки — 1,75 см.

Элюцию первых 8 фракций проводили начальным буфером (0,2 М трис-НСl, рН = 9), а десорбцию фиксированных белков во фракциях с 9 по 16 осуществлялась вторым буфером (0,2 М Na-цитрат, рН = 6).

Наличие углеводов в пробах определяли с помощью реакции Селиванова, а концентрацию белков — спектрофотометрией при длине волны $\lambda = 280$ нм.

3.2 Результат оценки поведения животных в тесте «Открытое поле»

Проведение психологического анализа поведения животного предполагает основательное изучение движений животного в процессе

решения специфических задач, с целью получить наиболее точное представление о его исследуемых психических качествах.

В тесте «Открытое поле» были получены результаты, отражающие влияние режимов поведенческой информации у крыс: горизонтальная и вертикальная двигательная активность, обследование отверстий и психоэмоциональные проявления: фризинг, груминг, уровень дефекаций.

Когда животные оказываются в незнакомой обстановке, они часто испытывают страх и выражают желание оставаться или двигаться вдоль или вокруг стен. Однако, после оценки уровня безопасности окружающей обстановки, грызуны могут начать осваивать и использовать центральный сектор (рисунок 10).



Рисунок 10. Животное в периферийной и центральной зонах арены для теста «Открытое поле»

Результат исследования ГДА животных в центре арены представлен на рисунке 11.

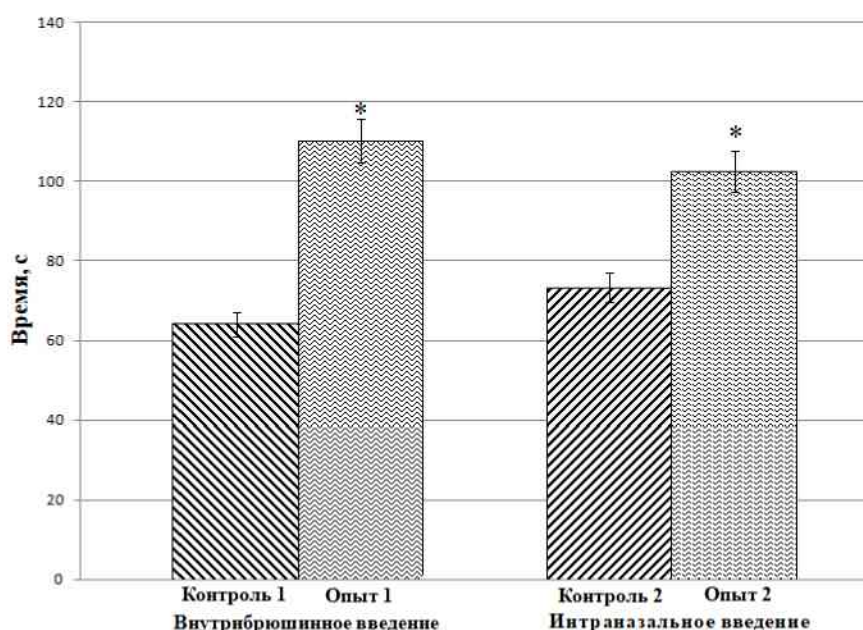


Рисунок 11. Результат ГДА в центре арены. (Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, различия статистически достоверны)

Длительное внутривбрюшинное введение пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа, приводило к увеличению ГДА на 60% по сравнению с контролем, интраназальное введение – на 45%.

Горизонтальная двигательная активность (ГДА) животных включает пробежки по разным траекториям, вплоть до кружения вокруг одного места. Она отражает общий уровень активности и исследовательского поведения крыс в новой среде. Когда животные оказываются в незнакомой обстановке, они часто испытывают страх и выражают желание оставаться или двигаться вдоль или вокруг стен. Однако, после оценки уровня безопасности окружающей обстановки, грызуны могут начать осваивать и использовать центральный сектор.

Результаты исследования показывают, введение пептидных фракции трутневого расплода снижает тревогу и уровень страха, что приводит к более

активному исследовательскому поведению крыс в новой среде. Они начали исследовать новые сектора в центре арены, проявили большую моторную активность в форме бега. Соответственно, это привело к увеличению времени нахождения в центральной части арены, что свидетельствует о снижении уровня стресса у животных.

Результат исследования ГДА животных в периферии арены представлен на рисунке 12.

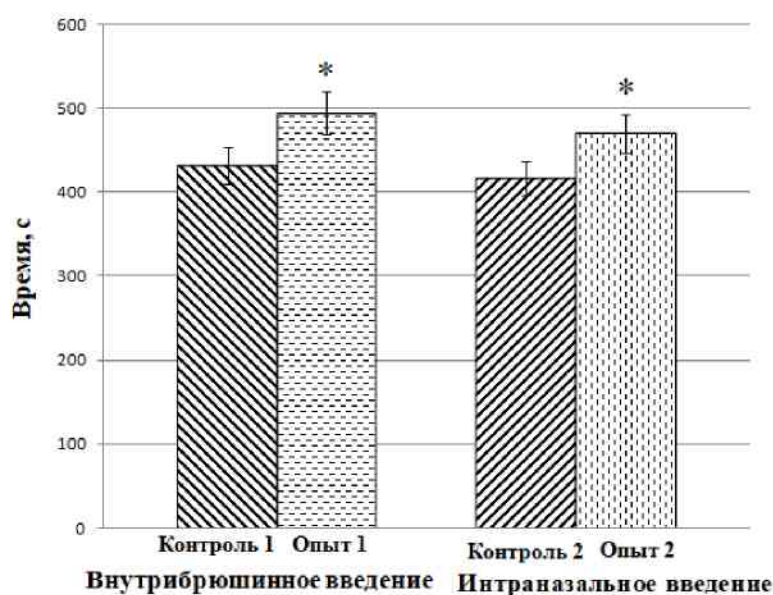


Рисунок 12. Результат ГДА в периферии арены. (Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, различия статистически достоверны)

Длительное внутрибрюшинное введение пептидных фракций трутневого расплода, с молекулярной массой 5-10 кДа, привело к увеличению ГДА в периферии арены на 25% по сравнению с контролем, интраназальное – на 13 %.

Увеличение ГДА в периферии арены в тесте «Открытое поле» указывает на активное исследовательское поведение крыс.

В отсутствии стрессового воздействия животные обычно проявляют интерес к исследованию новой среды. Увеличение ГДА в периферии арены

свидетельствует о том, что животные активно перемещаются по арене, исследуют новые области и проявляют исследовательское поведение.

Более высокий уровень ГДА в периферии арены может указывать на увеличенную моторную активность животного, проявление интереса к окружающей среде, более низкий уровень тревожности и стресса или большую уверенность в исследовании новой среды. По результатам ГДА мы наблюдаем значительную тенденцию к снижению стресса и адаптацию животных к новым условиям.

Результат общей ВДА представлен на рисунке 13.

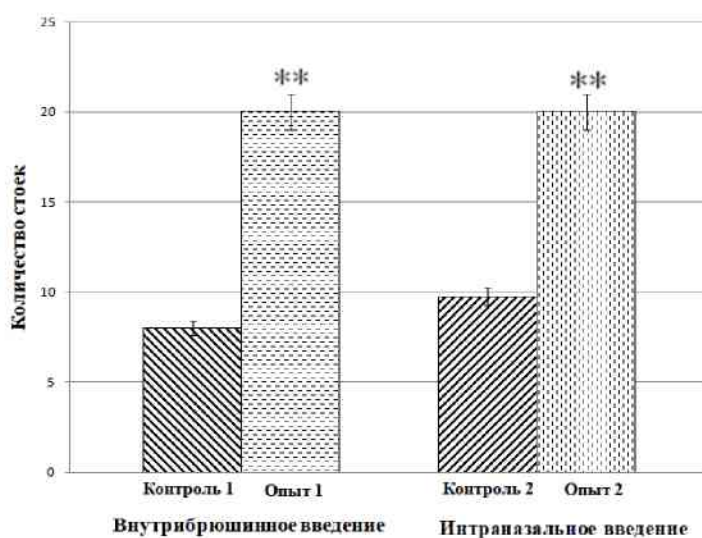


Рисунок 13. Результат общей ВДА. (Примечание. ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем, высокая достоверность результата)

Длительное внутрибрюшинное введение пептидных фракций трутневого расплода привело к увеличению ВДА на 29 %, интраназальное введение – на 40%.

Вертикальная двигательная активность (ВДА) животных в открытом поле представлена двумя видами стоек: Climbing (где задние лапы остаются на полу, а передние упираются в стенку поля) и Rearing (где животное остается на весу, поднимаясь на задние лапы). Для анализа результатов рекомендуется использовать общую ВДА, учитывая оба вида стоек. Это

позволяет получить более полное представление о вертикальной активности животных в открытом поле.

Когда животные испытывают тревогу или стресс, они могут проявлять более пассивное поведение и ограничивать свою активность. Увеличение ВДА после введения пептидных фракций трутневого расплода указывает на более активное исследовательское поведение животных. Они начали проявлять интерес к окружающей среде, производить больше вертикальных движений, таких как стояние на задних и передних лапах, вертикальные осмотры. Следовательно, может сделать вывод, что введение пептидных фракций трутневого расплода указывает на снижение тревоги и стресса у крыс, что привело к увеличению ВДА.

Результаты оценки исследования норкового рефлекса представлен на рисунке 14.

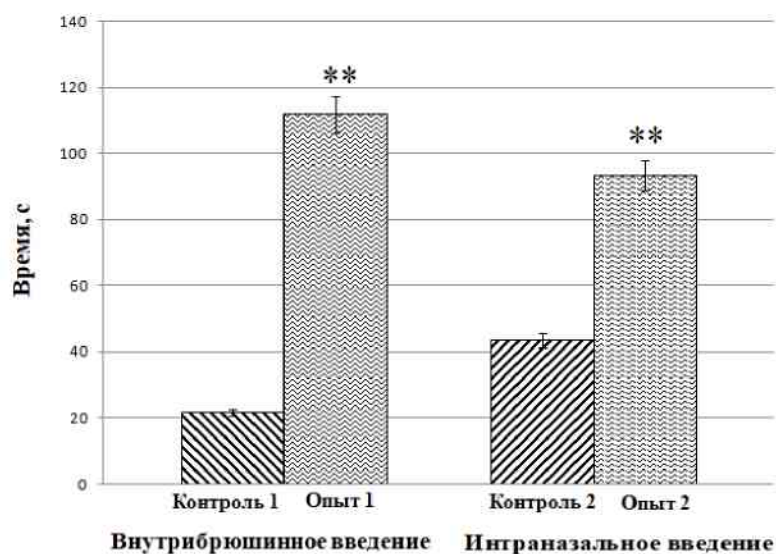


Рисунок 14. Результат исследования норкового рефлекса. (Примечание. ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем, высокая достоверность результата)

Обнюхивание после длительного внутрибрюшинного введения увеличилось в 1,3%, интраназальное введение – на 65%.

Поиск отверстий или «норковый рефлекс» – является одним из проявлений способности животных исследовать открытое поле, с помощью которого животные получают информацию об окружающей среде и обнаруживают потенциальные источники пищи, запахи или социальные сигналы. Увеличение обнюхивания отверстий указывает на проявление исследовательского интереса и повышенную моторную активность крыс.

Введение пептидных фракций трутневого расплода снизил уровень тревоги и страха, что привело к увеличению исследовательского поведения и интереса к окружающей среде, что проявилось в увеличении обнюхивания отверстий.

Результат исследования груминга представлен на рисунке 15.

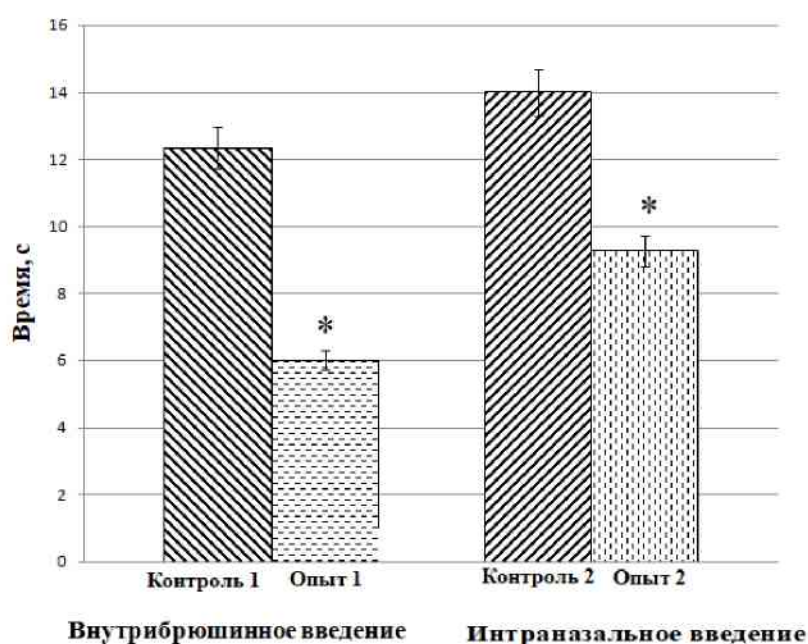


Рисунок 15. Результат исследования груминга. (Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, различия статистически достоверны)

После длительного внутрибрюшинного введения пептидных фракций трутневого расплода груминг уменьшился на 50% по сравнению с контролем, интраназальное введение – на 33%.

Груминг представляет собой акт самоочищения и ухода за шерстью и телом животного. Сюда входит: мытьё вокруг глаз, заведение лап за уши, переход к мытью всей головы, лап, боков, тела, аногенитальной области, хвоста.

В ситуациях, когда животные испытывают тревогу или стресс, они могут увеличивать груминг в попытке снять напряжение и успокоиться. Согласно полученным результатам, уменьшение груминга указывает на более спокойное и расслабленное состояние животных. Когда они чувствуют себя менее тревожно, им может потребоваться меньше самоухода и очистки шерсти.

Результат значения дефекации представлен на рисунке 16.

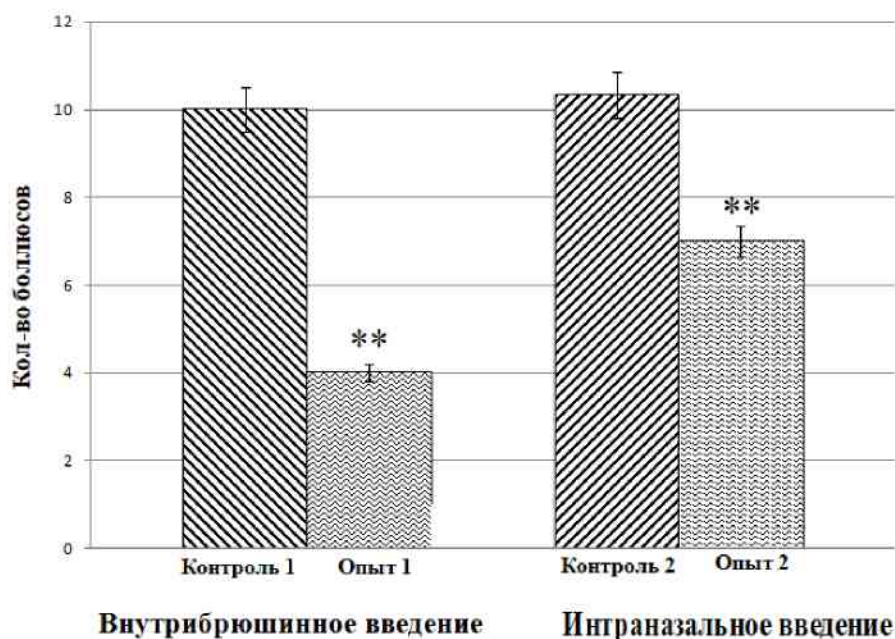


Рисунок 16. Результат количественной оценки дефекации. (Примечание.

**** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем, высокая достоверность результата)**

Длительное внутривентриальное введение снизил уровень дефекации на 43 %, интраназальное введение – на 75%, по сравнению с контролем.

Степень дефекации считается показателем «эмоциональности» животного. Для определения уровня дефекации и эмоционального состояния

животного, подсчитывали число болюсов, оставленных во время пребывания в экспериментальной установке. Когда животные находятся в состоянии тревоги или стресса, они могут проявлять повышенную дефекацию, что связано с активацией системы стресса и адаптивного ответа организма. Снижение дефекации свидетельствует о более устойчивом и расслабленном состоянии животных. Уменьшение акта дефекации – это результат сниженного воздействия стрессовых факторов на организм животных и улучшения их эмоционального благополучия. Уменьшение дефекации после введения пептидных фракций трутневого расплода указывает на снижение уровня тревоги и более спокойное состояние животных.

Результат фризинга представлен на рисунке 17.

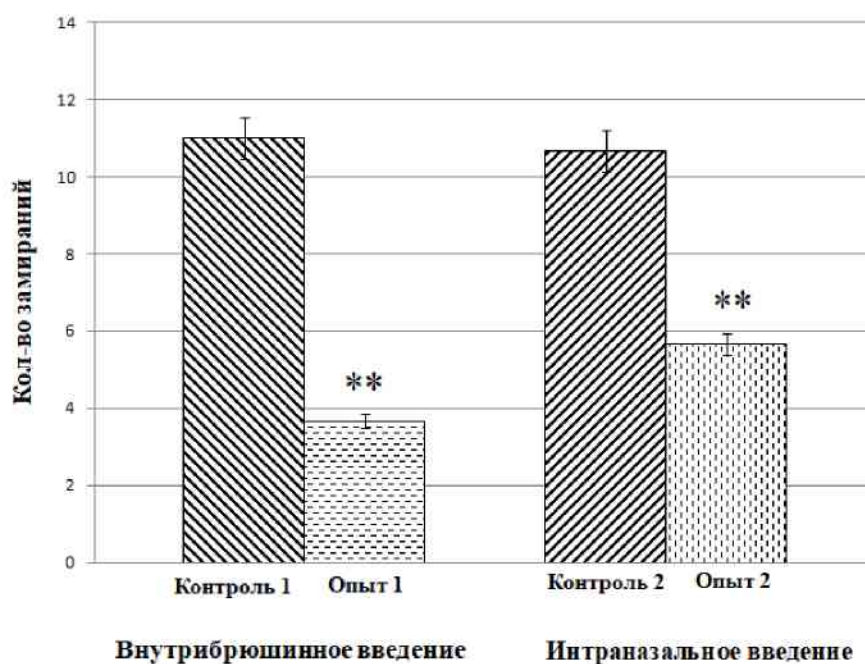


Рисунок 17. Результат фризинга. (Примечание. ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем, высокая достоверность результата)

Длительное внутривбрюшинное введение снизил степень фризинга на 50 %, интраназальное введение – на 35%.

Фризинг - это реакция, при которой животное замирает в неудобной и напряженной позе, например, с приподнятым хвостом или лапой. Во время

фризинга животное обычно не проявляет активных движений и остается полностью неподвижным, только вибриссы (щетинки) могут слегка двигаться. Введение препаратов с анксиолитическим эффектом может помочь снизить уровень тревоги и страха у животных, что приведёт к уменьшению фризинга. Животные могут проявлять более активное поведение, исследовать окружающую среду и проявлять повышенную моторную активность, вместо замирания на месте.

В результате, введение пептидных фракций трутневого расплода снизило количество замираний, что указывает на более спокойное и менее пассивное состояние животных. Снижение уровня тревоги способствовало нормализованному поведению, когда животные чувствуют себя более уверенными в окружающей среде.

Таким образом, по результатам испытаний в тесте «Открытое поле», можно сделать вывод, что пептидные фракции трутневого расплода обладают анксиолитическим эффектом. Интраназальное и внутривентральное введение пептидов трутневого расплода в течение 21 дня уменьшило эмоциональное расстройство и увеличило горизонтальную, двигательную, исследовательскую активность.

3.3 Результат поведения животных в тесте «Тёмная/светлая камера»

Для выявления изменений стрессового состояния животных был использован тест «Темно-светлая камера».

В тесте использовали несколько поведенческих показателей, чтобы изучить активность животных: сколько раз они выглядывали из темного отсека в светлый, сколько раз они выходили в светлый отсек (рисунок 18), сколько времени они проводили, выглядывая, и как долго они оставались в освещенной части камеры (в сек).

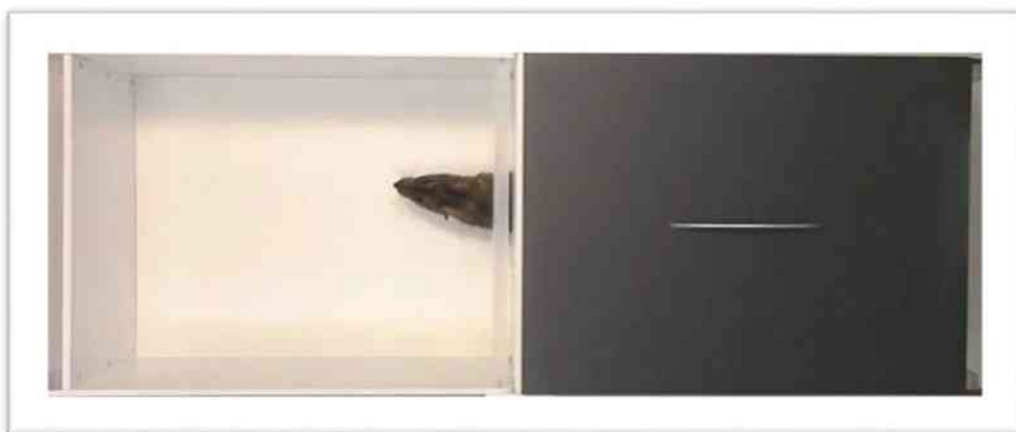


Рисунок 18. Выход крысы из темного отсека в светлый участок

Результат латентного времени выхода (с) из темного отсека в светлый представлен на рисунке 19.

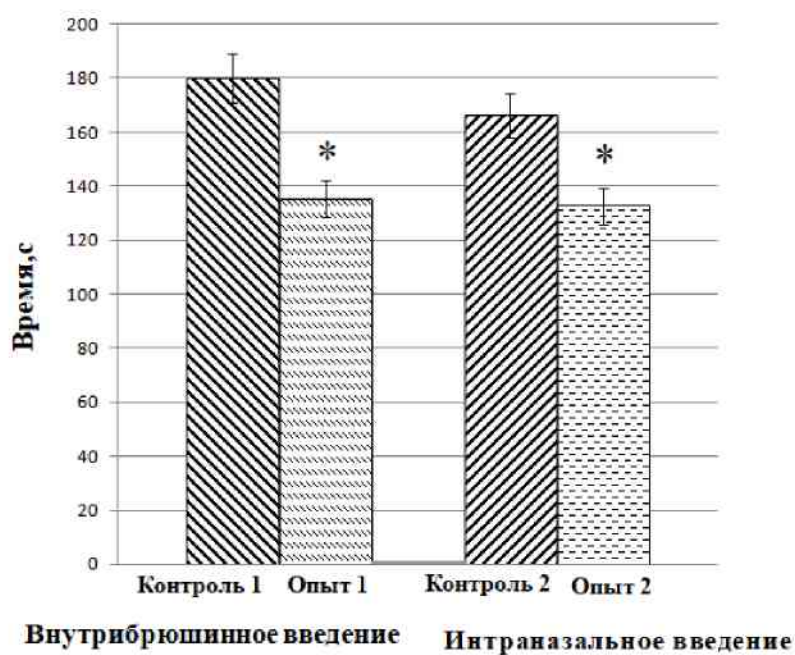


Рисунок 19. Латентное время выхода (с) из темного отсека в светлый.

(Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, различия статистически достоверны)

Длительное внутрибрюшинное введение пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа, привело к

уменьшению латентного времени выхода из тёмного отсека в светлый на 13%, интраназальное введение – на 10%.

Уменьшение латентного времени говорит о более быстрой и активной реакции крыс на стрессоры, связанные с переходом из тёмного в светлый отсек. В данном случае, пептидные фракции трутневого расплода, снижают уровень тревоги и страха у крыс, что позволяет им более быстро и решительно реагировать на изменения в окружающей среде. Уменьшение латентного времени свидетельствует о повышенной моторной активности и сниженной осторожности у крыс после их введения.

Количество выходов в светлый участок представлен на рисунке 20.

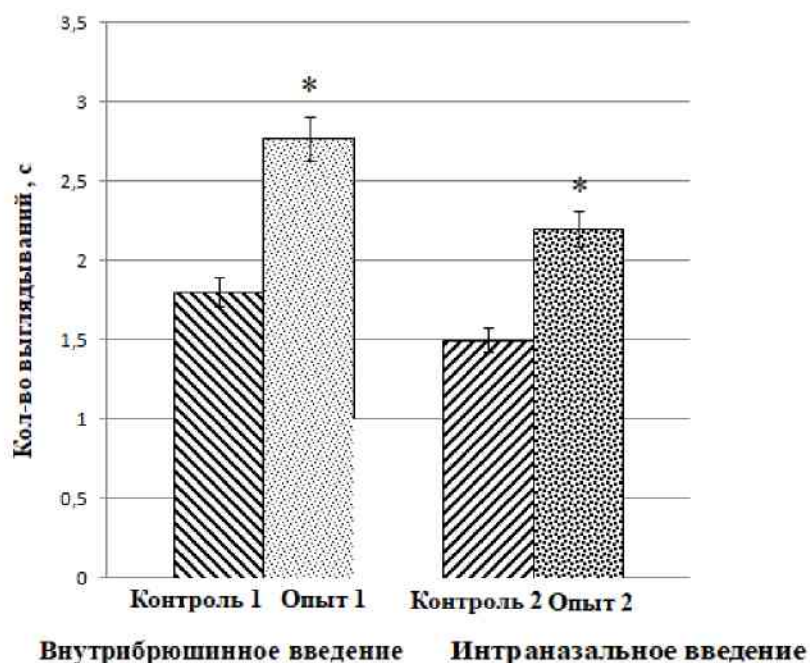


Рисунок 20. Количество выходов в светлый участок. (Примечание.

* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, различия статистически достоверны)

Длительное внутривентриальное введение пептидных фракций трутневого расплода, привело к увеличению выходов в светлый отсек на 50%, интраназальное введение – на 33%.

Когда крысы испытывают меньшую тревожность, они могут быть более мотивированы и заинтересованы в исследовании новой среды. Введение пептидных фракции трутневого расплода создали более благоприятные условия для крыс, позволяя им чувствовать себя комфортно и безопасно в светлой камере. Это привело к повышенной моторной активности и исследовательскому поведению, включая более частые выходы в светлую область. Увеличение количества выходов в светлый участок также может свидетельствовать о повышенной осмтрительности и любопытстве крыс.

Следовательно, уровень тревоги снизился, крысы чувствуют себя увереннее и склонны к исследованию новой среды.

Результат продолжительности нахождения в светлом участке представлен на рисунке 21.

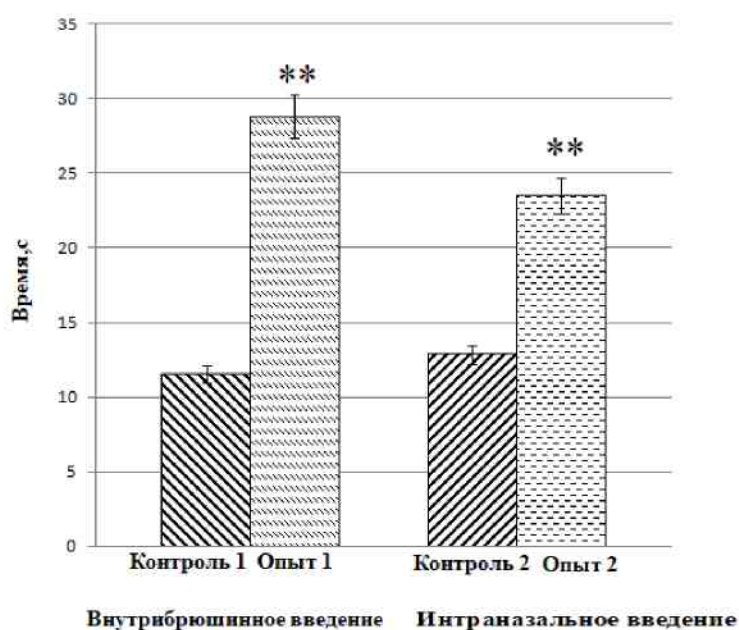


Рисунок 21. Продолжительность (с) нахождения в светлом участке.

(Примечание. ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем, высокая достоверность результата)

Длительное внутрибрюшинное введение пептидных фракций трутневого расплода, привело к увеличению продолжительности нахождения в светлом отсеке на 21%, интраназальное введение – на 17%.

Увеличение продолжительности нахождения крыс в светлом участке повысилось, это указывает на повышение уровня комфорта и уверенности у животных в данной среде.

Крысы почувствовали себя более защищенными и меньше подверженными стрессу, что привело к увеличению времени, проведенного в светлой области. Увеличение продолжительности нахождения в светлом участке может также свидетельствовать о положительной реакции животных на световую стимуляцию. Пептидные фракции трутневого расплода могут влиять на восприятие и реакцию крыс на свет, делая его более привлекательным и менее пугающим для животных. Как результат, крысы предпочитают находиться в светлой камере и проводить там больше времени.

Результат суммарной длительности выглядывания в освещенную часть камеры представлен на рисунке 22.

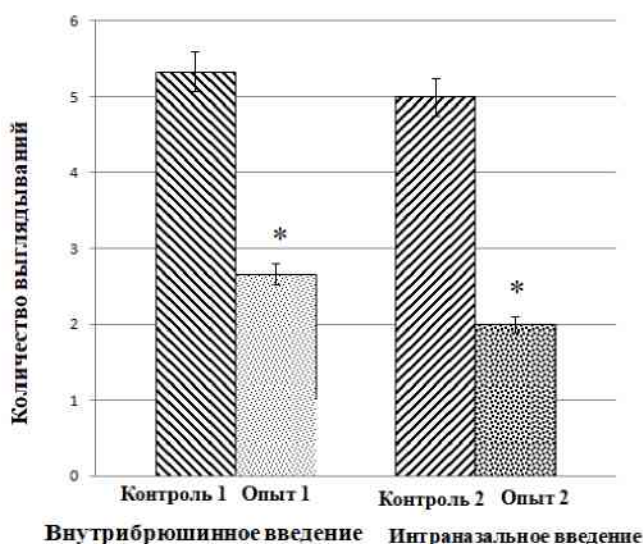


Рисунок 22. Суммарная длительность (с) выглядывания в освещенную часть камеры. (Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, различия статистически достоверны)

Длительное внутрибрюшинное введение пептидных фракций трутневого расплода, привело к уменьшению выглядывания в светлую часть камеры на 50%, интраназальное введение – на 33%.

Уменьшение числа выглядываний крыс из темной камеры указывает на снижение уровня тревоги у животных. Введение пептидных фракций трутневого расплода уменьшили ощущение опасности и угрозы. Это привело к снижению необходимости выглядывания из темного участка для оценки безопасности окружающей среды перед выходом.

Результат продолжительности 1 выхода в освещенную часть камеры представлен на рисунке 23.

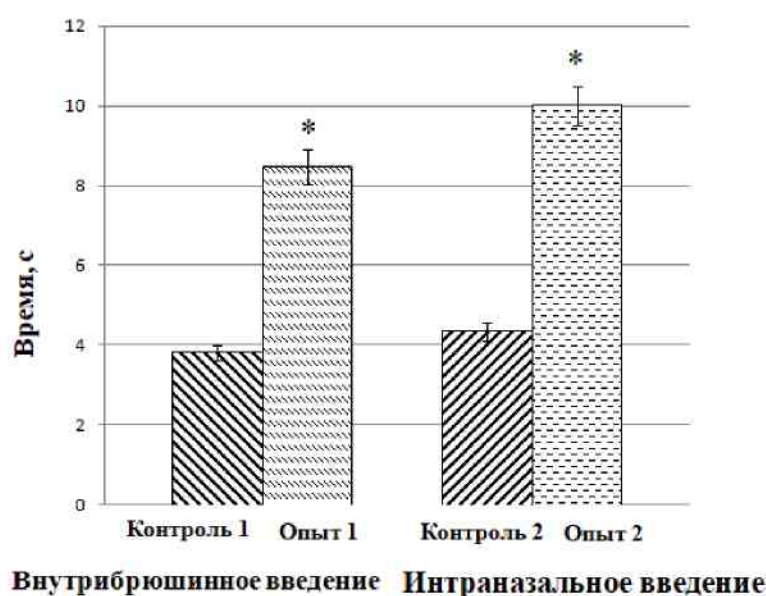


Рисунок 23. Продолжительность (с) 1 выхода в освещенную часть камеры.

(Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, различия статистически достоверны)

Длительное внутрибрюшинное введение пептидных фракций трутневого расплода, привело к увеличению продолжительности 1 выхода в светлую часть камеры на 20%, интраназальное введение – на 28%.

Увеличение продолжительности одного выхода крыс в освещенную часть камеры после введения пептидных фракций трутневого расплода

указывает на снижение уровня тревоги и длительное исследование новой среды. Введение пептидных фракций увеличило их уверенность, и снизило страх перед переходом в освещенную область. Крысы чувствовали себя комфортно и безопасно, что позволило им проводить больше времени в освещенной части камеры. Увеличение продолжительности одного выхода свидетельствуют о более глубоком исследовании нового окружения, возможно, в поисках ресурсов, потребностей или социального взаимодействия. Таким образом, увеличение продолжительности одного выхода указывают на более активное и целенаправленное исследование крысами светлой области камеры, прежде чем они возвращаются в темную часть.

Исходя из результатов теста "Темная/светлая камера" после внутрибрюшинного и интраназального введения пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа, можно сделать вывод, что они обладают анксиолитическим эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы было оценено анксиолитическое действие пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа, в тестах: «Открытое поле», «Тёмная и светлая камера».

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что метод выделения пептидов с использованием комбинации методов тангенциальной ультрафильтрации, ионообменной хроматографии с использованием DEAE-целлюлозы, гель-фильтрации на сефадексе G-25 позволяет получить очищенные пептидные фракции с молекулярной массой 5-10 кДа.
2. Обнаружено, что оба варианта введения (внутрибрюшинное и интраназальное) пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводят к изменению поведения животных в тесте «Открытое поле», а именно к увеличению: ГДА, ВДА, норкового рефлекса, и к снижению: груминга, фризинга, дефекаций по сравнению с контролем.
3. Обнаружено, что оба варианта введения (внутрибрюшинное и интраназальное) пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводят к изменению поведения животных в тесте «Тёмная/светлая камера». Наблюдается увеличение выходов, продолжительности нахождения в светлом участке, продолжительности 1 выхода в освещённую часть по сравнению с контролем и снижение латентного времени выхода из тёмного отсека, числа выглядываний в освещённую часть.
4. Выявлено, что изменения данных показателей поведения в тестах «Открытое поле» и «Тёмная/светлая камера» свидетельствует о наличии анксиолитического эффекта данных пептидных фракций.

Дальнейшие исследования и эксперименты могут быть направлены на подтверждение и детальное изучение этих результатов, а также на разработку практических рекомендаций возможного использования пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в медицине или других областях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авруцкий Г.Я., Недува А.А. Лечение психически больных. М.: Медицина, 1988. 528 с.
2. Арана Д., Розенбаум Д. Фармакотерапия психических расстройств. Пер. с англ. М.: «Издательство БИНОМ», 2006. 416 с.
3. Астапов В.М., Гасилина А.Н. Генез тревоги и депрессии // Мир психологии. 2011. Т. 65, № 1 С. 225–233
4. Вербицкий Е.В. Взаимоотношения тревоги и сна в эксперименте и клинике // Журнал неврологии и психиатрии. 2017; Т. 2, №4.
5. Воронина Т. А., Середенин С. Б. Перспективы поиска анксиолитиков // Эксперим. и клин. фармакология. 2002. Т. 65, № 5.
6. ГОСТ 34088–2017 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными. Москва: Стандартинформ, 2017, 29с.
7. ГОСТ Р 50258–92 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. Москва: Московский печатник, 1994, 24с
8. Данилов Д.С. Оптимизация лечебного процесса у больных психозами, резистентных к антипсихотической терапии // Российский психиатрический журнал. 2010. №4.
9. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казахова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине. Биомедицина. 2012; 4: 15
10. Корабельникова Е.А. тревожные расстройства в условиях пандемии covid-19 // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2021. №1.
11. Литвинцев С.В. Успенский Ю.П., Балукоева Е.В. Новые возможности терапии тревожных расстройств // Российский психиатрический журнал. 2007. № 3. С. 72–78

12. Мартимьянова Л. А., Макиенко Н. В., Усань Н. Ю. Блокаторы бета-адренорецепторов в терапевтической клинике // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия Медицина. 2008. №16 (831).
13. Машковский М.Д., Андреева Н.И., Полежаева А.И. Фармакология антидепрессантов. Москва: Медицина, 1983 г. 240 страниц.
14. Миронов А.Н, "Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств", М: Гриф и К, 2015, 592 с
15. Миронов А.Н., Бунамян Н.Д., Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, ч1, Москва, 2012
16. Митрофанов Д.В., Будникова Н.В., Брандорф А.З. Применение трутнёвого расплода в рациональном питании и апитерапии. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2021;22(2):188-203
17. Нехорошкова А.Н., Большевидцева И.Л. Нейробиологические предпосылки формирования тревожных состояний // Вестник САФУ. 2016. №3. С. 24–36. doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.3.24
18. Прошин А.Т. Сторожева З.И., Болотина О.В. Дофаминовые рецепторы D2 класса нейронов префронтальной коры и нейробиологические механизмы страха и тревоги // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 5. С. 209
19. Распопова Н.И. Тревожно-депрессивные расстройства и патогенетические основы их терапии // Медицина (Алматы). 2018. Т. 197, № 11. С. 9398. DOI 10.31082/1728-452X-2018-197-11-93-98.
20. Смулевич А.Б. Депрессии в общей медицинской практике" (М., 2000).
21. Тверской В.А. Мембранные процессы деления. Полимерные мембраны. Учебное пособие М., МИТХТ им. М.В.Ломоносова, 2008.
22. Усов Л.А., Суфианова Г.З., Минакина Л.Н.: Нейролептики, транквилизаторы, седативные средства: учебное пособие для самостоятельной работы студентов / ГОУ ВПО ИГМУ Росздрава, Иркутск, 2010. 49с.
23. Харкевич Д. А. Фармакология. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. С. 225–229.

24. Харкевич Д.А Основы фармакологии. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015, 720 с.
25. Шейдер Р. Психиатрия. Перевод с английского. М.: «Практика». 1998. 485с. [Shejder R. Psihiatriya. Perevod s anglijskogo. M.: «Praktika». 1998. 485p. (In Russ.)].
26. Юматов Е.А. Психофизиология эмоций и эмоционального напряжения студентов: Монография // Издательство ИТРК. 2017. С.199.
27. Bentall R. Spike in anxiety and depression following UK lockdown announcement, study reveals. Accessed May 20, 2020.
28. Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 2003; 463(1-3):55-65. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01274-3 Clinical pharmacology of anxiolytics Michel Bourin 2018
29. Bourin, Michel. (2018). Clinical pharmacology of anxiolytics. *Archives of Depression and Anxiety*. 4. 021-025. 10.17352/2455-5460.000029
30. Daviu N., Bruchas M.R., Moghaddam B., Sandi C., Beyeler A. Neurobiological links between stress and anxiety // *Neurobiol Stress*. 2019. V. 11. P.100191. doi: 10.1016/j.ynstr.2019.100191
31. Gary Walsh. Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications. 2007. 499 p
32. Gottschalk M.G., Domschke K. Genetics of generalized anxiety disorder and related traits // *Dialogues Clin Neurosci*. 2017. Vol. 19, № 2. P. 159-168. doi: 10.31887/DCNS.2017.19.2/kdomschke
33. Honek J. Preclinical research in drug development. / J. Honek. // *Communications Consulting & Medical Writing*. 2017. Vol.26. № 4. pp. 5-7.
34. Huang, W., Percie du Sert, N., Vollert, J., Rice, A.S.C. General Principles of Preclinical Study Design. In: Bespalov, A., Michel, M., Steckler, T. (eds) *Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine. Handbook of Experimental Pharmacology*. 2019. Vol.257. pp.55-57.

35. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011. p.22.
36. Liu S., Yang L., Zhang C., Xiang Y., Liu Z. [et al.]. Online mental health services in China during the COVID-19 outbreak. *Lancet Psychiatry*, 2020;7(4):17-18.
37. Prager E.M., Bergstrom H.C., Wynn G.H., Braga M.F. The basolateral amygdale gamma-aminobutyric acidergic system in health and disease // *J. Neurosci. Res.* 2016. Vol. 96, № 6. P. 548–567
38. "Preclinical Psychopharmacology" by Royce L. Johnson and M. Foster Olive
39. Salvador A., Suay F., González-Bono E., Serrano, M. A. Anticipatory cortisol, testosterone and psychological responses to judo competition in young men // *Psychoneuroendocrinology*.2003. Vol. 28.P. 364–375. doi: 10.1016/S0306- 4530(02)00028-8.
40. Sharp B.M. Basolateral amygdale and stress-induced hyperexcitability affect motivated behavior and addiction // *Transl. Psychiatry*.2017.V.7, № 8.P. 1–13
41. Steinmetz, K.L., Spack, E.G. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications./ K. L. Steinmetz, E. G. Spack.// *Proceedings of the 2009 Drug Discovery for Neurodegeneration Conference*. 2009. Vol.9. № 1. pp.1-4