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:

«ИЗУЧЕНИЕ НООТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ В РАМКАХ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ»

Студент _____ Митронькина Карина Владимировна

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 отлично

(протокол заседания ГЭК от 04.07.23 №5)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Введение ... **3**

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ... **6**

1.1 Общая характеристика ноотропных лекарственных средств ... 6

1.2 Этапы доклинических исследований лекарственных препаратов ... 11

1.3 Особенности пептидов как лекарственных препаратов ... 15

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ... **21**

2.1 Выделение пептидных фракций из трутневого расплода ... 22

2.1.1 Ультрафильтрация и ионообменная хроматография для получения пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа ... 22

2.1.2 Определение содержания пептидов и углеводов спектрофотометрическим методом ... 24

2.2 Физиологические тесты для оценки ноотропной активности. Тест «Открытое поле» ... 25

2.3 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» ... 26

2.4 Статистическая обработка данных ... 28

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ... **29**

3.1 Очистка от углеводов и разделение белков и пептидов методом ионообменной хроматографии ... 30

3.2 Результаты распознавания новых объектов животными в тесте «Открытое поле» ... 33

3.3 Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» ... 37

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ... **41**

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ... **43**

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Усиление воздействия неблагоприятных социальных и биологических факторов приводит к увеличению доли непсихотических органических депрессивных расстройств среди населения трудоспособного возраста. При этом органическая депрессивная симптоматика сопровождается нейрометаболитическими нарушениями в центральной нервной системе.

Было доказано, что стресс для человеческого организма не безвреден. Стресс – это фактор риска большинства сердечно-сосудистых заболеваний, оказывающий негативное воздействие на нервную систему, в последствие чего у человека ухудшается память, снижается работоспособность, искажается восприятие и ухудшаются процессы мышления. В связи с этим необходимо заниматься поиском и разработкой путей профилактики и коррекции отрицательного воздействия стресса на нервную систему.

На современном российском фармацевтическом рынке существует широкий выбор лекарственных препаратов. В области нейрофармакологии центральное место занимают ноотропные препараты.

Ноотропные препараты – это особая группа нейропсихотропных препаратов, специфический эффект которых определяется способностью улучшать процессы обучения и памяти, когнитивные, интеллектуальные функции как у здоровых лиц, так и нарушенные функции в ходе различных заболеваний.

Ноотропы широко применяются при старении организма; психоорганических синдромах нейродегенеративного или сосудистого генеза (сенильная деменция, в том числе болезнь Альцгеймера); при острых и хронических наршениях мозгового кровообращения, в том числе при инсультах и энцефалопатиях; после черепно-мозговых травм, нейроинфекций; при остром и хроническом утомлении, синдроме

хронической усталости, при стрессе, болевых синдромах; при заболеваниях, вызванных длительным приемом алкоголя и наркотиков, терапией анксиолитиками, антипсихотическими средствами и другими депрессантами ЦНС; при астеническом, астено-депрессивном и депрессивном синдромах, невротических расстройствах, вегето-сосудистой дистонии, головокружении; для профилактики укачивания.

В педиатрии ноотропные препараты популярны при цереброастенических, энцефалопатических нарушениях, расстройствах памяти, при задержке психического и речевого развития, умственной отсталости, при последствиях перинатального поражения ЦНС, синдроме дефицита внимания с гиперактивностью. Ноотропы используются здоровыми людьми, когда в силу определенных ситуаций необходимо повысить умственную работоспособность, концентрацию внимания, улучшить продуктивность работы, способность к планированию и принятию решений, увеличить скорость извлечения памятного следа и объем памяти.

Для того, чтобы сохранить на высоком уровне когнитивные способности человека было бы неплохо разработать биологически активные добавки, которые помогли бы людям повысить обучающуюся способность.

Врачами рекомендуется прием синтетических лекарственных средств нейропротекторного эффекта, в число которых входят ноотропные препараты для улучшения познавательной активности. Синтетические лекарственные препараты с ноотропным эффектом по своей терапевтической оперативности могут не каждый раз удовлетворять всем условиям клинической фармакологии, из-за того, что насчитывается широкий ряд побочных эффектов: повышенная раздражительность, нарушение сна, экстрапирамидные расстройства, головокружение, диспептические расстройства, гепатотоксическое действие, побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы, а также многие другие, что ограничивает их применение.

Природные вещества, например продукты пчеловодства, могли бы использоваться для получения добавок с ноотропными эффектами. Эти вещества в большей части случаев не обладают токсичным действием и достаточно редко способны вызывать побочные эффекты и могут помочь решить эту проблему.

Цель работы: Изучить основные этапы доклинических исследований препаратов с ноотропной активностью и оценить наличие ноотропной активности пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Открытое поле с объектами».

Задачи:

1) Выделить и очистить от углеводных компонентов пептидные фракции с молекулярной массой 5-10 кДа из трутневого расплода с применением методов тангенциальной ультрафильтрации и ионообменной хроматографии;

2) Оценить поведение лабораторных животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: груминг, количество стоек в закрытых/открытых рукавах, горизонтальная двигательная активность;

3) Оценить поведение лабораторных в тесте «Открытое поле с объектами»: горизонтальная двигательная активность, вертикальна двигательная активность, выход в центр арены;

4) Провести обработку результатов и оценить наличие ноотропной активности пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа.

Выпускная квалификационная работа написана на 47 листах, содержит 16 рисунков и список литературы на английском и русском языках из 39 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика ноотропных лекарственных средств

Исходя из определения ВОЗ: «Ноотропы – это фармакологические средства, которые обеспечивают прямое активирующее действие на обучение, усовершенствующие память и умственную деятельность, а также улучшающие устойчивость мозга к агрессивным воздействиям гипоксии, травмам и интоксикации» [2]. Отсюда можно сделать вывод, что в основе действия ноотропных средств лежат два ключевых принципа: влияние на интеллектуально-мнестические функции и церебропротекторные свойства, при отсутствии психомоторного возбуждения [12].

Автогенез нейропротекции разрешает выделить два основных направления: первичную и вторичную нейропротекцию. Осуществление первичной протекцииосложнено недостаточностью данных, которые поясняют специфические морфо–функциональные основы механизма действия и самим определением задействованных в повреждении рецепторов. В связи с этим в основу действия большинства нейропротекторных препаратов положена вторичная протекция, направленная на сокращение выраженности последствий от повреждений нервной системы [4].

Немногие исследователи выделяют истинные ноотропы и ноотропоподобные средства. Подлинные ноотропы обладают прямым действием с доминирующими мнестическими эффектами в норме и при наличии повреждений нервной системы. Средства, подобные ноотропам обладают поливалентной комплексной активностью и оказывают действие при патологиях центральной нервной системы (ЦНС) [3].

Ноотропные средства принадлежат к различным химическим группам и обладают отличительными механизмами действия. В связи с этим сложно определить состав группы входящих туда препаратов, а так же тяжело их

классифицировать. В обобщем виде классификацию можно представить следующим образом (Рисунок 1) [5].

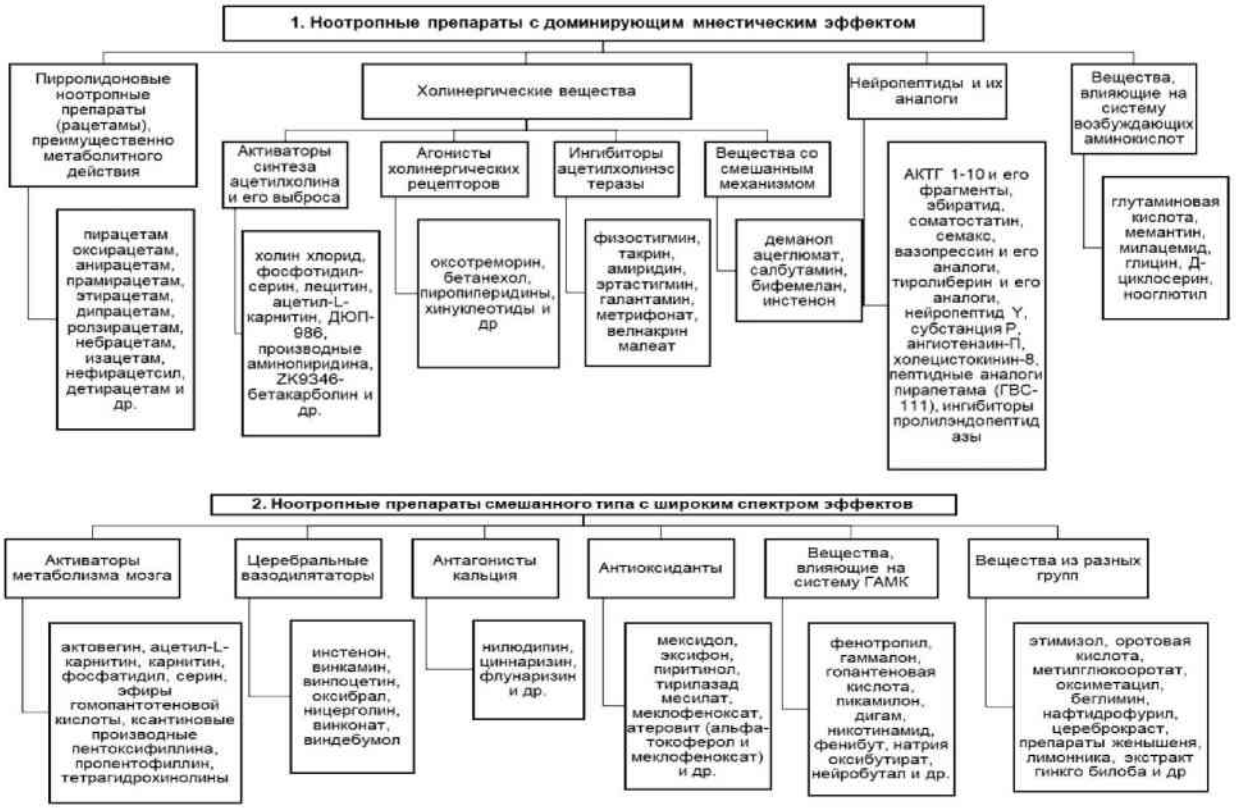

Рисунок 1. Классификация ноотропных препаратов

В основе терапевтического действия ноотропных средств положено комплексное воздействие не на несколько систем и главным образом на нейромедиаторную. Позволено выделить общие для группы средств следующие механизмы действия:

1. Улучшение и нормализация мозгового кровообращения и микроциркуляции в ЦНС и сердце;

2. Облегчение активации передачи нервного импульса на разных этапах, в том числе влияние на синаптическую передачу и на нейромедиаторы, такие как ацетилхолин, дофамин, норадреналин, серотонин и ГАМК, что приводит к увеличению когнитивных функций и улучшению процессов обучения и памяти;

3. Повышение энергетического обмена в клетках и тканях, в том числе в клетках головного мозга, повышение активности ферментов дыхательной цепи, стимуляция потребления и утилизации глюкозы, синтез АТФ, белков и фосфолипидов;

4. Оказание мембраностабилизирующего действия [3, 13].

Область расширенного использования данной группы средств обуславливает помимо непосредственно ноотропного, следующие виды действия:

- мнемотропное,
- анксиолитическое,
- вазовегетативное,
- антиастеническое,
- психостимулирующее,
- антиэпилептическое,
- антидепрессивное,
- адаптогенное,
- седативное,
- антидискинетическое [7, 14].

Для ноотропных средств характерно наличие широкого спектра действий. В сферах педиатрии, а также геронтологии данные средства могут находить свое применение, но лишь у здоровых граждан. Ноотропные препараты обладают возможностью быть применимыми во время реабилитационного процесса лечения и во время процесса восстановления пациента при деменциях разного вида генеза, сюда же можно отнести болезнь Альцгеймера, при черепно-мозговых травмах, инсультах, нейроинфекциях, интоксикациях, в абстинентном периоде у больных наркоманией и алкоголизмом, при интеллектуально-мнестических расстройствах и нарушениях памяти, концентрации внимания и мышления.

Для здоровых граждан НЛС (ноотропные лекарственные средства) используют во время синдрома хронической усталости, после того, как человек был подвергнут физическим и психоэмоциональным нагрузкам и для того, чтобы повысить умственную работоспособность. Во время ухудшения равития у детей и во время излечения их от умственной отсталости [7, 13].

Ноотропные лекарственные средства являются одной из наиболее безопасных групп лекарственных средств. К увеличению потребления лекарственных препаратов данной группы и в свою очередь, к необоснованному и неконтролируемому приему привели: широкий ассортимент фармакологической активности, малое число побочных эффектов и отпуск лекарственных средств без рецепта врача [1].

Следует отметить следующие достаточно распространенные и всем узнаваемые ноотропные препараты:

1. пирацетам (нервозность, депрессии, тревога, галлюцинации, возбудимость, головная боль, тремор, тромбофлебит),
2. церебролизин (агрессивное поведение, бессонница, генерализованная эпилепсия, аритмия, лихорадка, озноб)
3. аминофенилмасляная кислота или фенибут (головная боль, сонливость, тревога, головокружение, тошнота)
4. периферические вазодилататоры: винпоцетин, ницерголин, нимодипин (перепады артериального давления, тахикардия, аритмия, нарушение сна) [1, 10].

В происходящее данное время продолжает осуществляться активный поиск и синтез совершенно иных новых нейропротекторных средств, которым необходимо включать в себя фармакологическую эффективность и безопасность. Ноотропные лекарственные средства должны легко переноситься и не оказывать побочных эффектов достаточно долгое время, так как применения данной группы лекарственных средств обычно рассчитаны на длительный курс применения.

При терапии неврологических заболеваний достаточно сложно избежать полипрагмазии, которая определяется необходимостью одномоментного воздействия как на ЦНС, так и на соматическую сферу [1, 11].

Из основных отрицательных последствий полипрагмазии следует отметить: возможность потенциирования известных побочных эффектов отдельных средств; возможность возникновения новых побочных эффектов; перекрещивание путей биотрансформации различных препаратов в организме, что приводит к значительному усилению или ослаблению их действия и в результате сложность подбора и соблюдения дозирования ЛП; высокая стоимость, особенно учитывая длительность лечения. Поэтому при назначении лечения должно отсутствовать перекрестное взаимодействие с наиболее часто назначаемыми нейротропными средствами [1,10].

Обращая внимание на то, что упоминалось ранее, наряду с достаточно широкой областью применения и большой возможностью применения, некоторые виды ноотропных средств способны вызывать побочные эффекты или даже быть токсичными для организма человека. Можно сделать вывод о том, что в настоящее время существует проблема достаточности выбора наиболее эффективных и безопасных нейропротекторных лекарственных средств [10].

Решением этой проблемы было создание комбинированных синтетических препаратов, содержащих два и более активных компонента с различными механизмами действия с целью снижения межлекарственного взаимодействия. Но, неожиданные побочные эффекты были выявлены даже у хорошо известных лекарственных средств, несмотря на тот факт, что теоретически такие сочетания были достаточнообоснованы [1].

1.2 Этапы доклинических исследований лекарственных препаратов

Доклинические исследования направлены на получение информации о безопасности и эффективности препарата-кандидата до его тестирования на людях [20]. Документы, подчиняющиеся системе установленных правил по исполнению доклинических исследований: Руководство по исполнению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова А.Н. и Лекарственные средства для медицинского применения – Доклинические токсикологические и фармакокинетические исследования безопасности (ГОСТ 56702 2015).

Доклинические диагностирования на устойчивость должны учитывать: (1) выбор идентичных видов животных; (2) возраст; (3) физиологическое состояние; (4) способ снабжения, включая дозу, способ введения и распорядок лечения; и (5) устойчивость испытуемого материала в условиях применения.

Информация о дозировании и степени токсичности соединения имеет очень важное значение для определения того, оправдано ли и достаточно безопасно ли продолжать клинические исследования и обеспечиваются исследованиями по фармакокинетике, фармакодинамике и токсикологии [17].

Фармакодинамика растолковывает взаимосвязанность между концентрацией лекарственного средства в организме и его биологическим эффектом (дозозависимостью). Это вносит в себя заключение вопроса о том, в какой мере мощным и эффективным является препарат с точки зрения его желаемого фармакологического эффекта, включая аспекты безопасности.

Действие лекарственного препарата обнаруживается количеством активного лекарственного препарата, который находится в организме, особенно если он в целевом участке. Это, в свою очередь, зависит от абсорбции, распределения, метаболизма и выведения соединения.

Значительное количество лекарств вводятся перорально и должны всасываться в желудочно-кишечном тракте, чтобы проникнуть в кровоток, что допускает им транспортироваться к месту их воздействия.

На своем пути к месту назначения препарат достигает печени, где осуществляется метаболизм первого прохождения. Следовательно, концентрация препарата – и, следовательно, его биодоступность – понижается перед поступлением в системный кровоток. Внутривенное введение препарата дает возможность обойти эффект первого прохождения, что подводит к большей биодоступности. Поступив в кровоток, препарат транспортируется в различные ткани.

Для изучения физиологических эффектов и оценки специфической ноотропной активности новых веществ используют простые методы тестирования «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Открытое поле с объектами». Это проводится для исследования влияния на обучение и память животных.

Чтобы определить, безопасен ли препарат для тестирования на людях, проводятся доклинические токсикологические исследования для обнаружения схемы лечения ассоциируется с наименьшей степенью токсичности и, таким образом, определяет подходящую и безопасную начальную дозу для клинических испытаний. Положив начало исследованиям с однократной дозой для установлени органов, которые могут быть подвержены токсичности препарата, доклинические исследования in vivo продолжаются с использованием подходов с повторными дозами [18].

Исследования при однократной дозе могут дать полезные данные для описания взаимосвязи дозы с системной и/или местной токсичностью. Эти данные могут быть использованы для выбора доз для повторных исследований токсичности доз. Информация о зависимости доза-реакция может быть собрана путем проведения исследования токсичности однократной дозы или в качестве компонента фармакологических

исследований или исследований эффективности на животных моделях.

Для биофармацевтических препаратов, вызывающие долгосрочные фармакологические/токсикологические эффекты, за животными из группы восстановления следует наблюдать до тех пор, пока не будет продемонстрирована обратимость. Долговременность исследований повторных доз должна основываться на предполагаемой продолжительности клинического воздействия и показаниях к заболеванию. Эта долговременность введения препарата животным обычно составляет 1-3 месяца для большинства фармацевтических препаратов биотехнологического происхождения. Для биофармацевтических препаратов, предназначенных для краткосрочного применения (например, < 7 дней) и для лечения острых угрожающих жизни заболеваний, повторные исследования доз продолжительностью до 2 недель были сочтены достаточными для поддержки клинических исследований, а также получения разрешения на продажу. Для тех биофармацевтических препаратов, которые предусмотрены для хронического применения, исследования продолжительностью 6 месяцев, как правило, были рациональными [19].

Важно исследовать потенциальную нежелательную фармакологическую активность на соответствующих моделях на животных и, при необходимости, включить особый мониторинг этих активностей в исследования токсичности и/или клинические исследования. Фармакологические исследования безопасности измеряют функциональные показатели потенциальной токсичности. Эти функциональные показатели могут быть группы в отдельных экспериментах или включены в план исследований токсичности [27].

Целью фармакологических исследований безопасности должно быть обнаружение различных функциональных эффектов на основные физиологические системы (например, сердечно-сосудистую, дыхательную, выделительную и центральную нервную системы). Изучения могут также

включать использование изолированных органов или других тест-систем, не связанных с интактными животными. Все эти исследования могут дозволить обосновать объяснение специфической токсичности для органов, которое следует детально учитывать в отношении использования человеком и показаний. Все животные подвергаются обычному клиническому обследованию, и периодически проводятся анализы, например, крови и мочи. В конце исследования проводится тщательное патологоанатомическое обследование всех животных [17].

Шанс разыскать повреждения и идентифицировать их биологичскую функцию, а также неповторимые свойства нам дает рассмотрение клеточной морфологии органов, а также тканей в токсикологическом опыте Необходимость предоставить правильный результат оценки микроскопического анализа требует умений поиска отличий в гистоморфологической структуре здорового и поврежденного органа.

В продолжительных испытаниях необходимо обращать особое внимание на реакции тканей экспериментальных животных по сравнению с контрольными животными. При проведении коротких исследований токсичности микроскопический анализ определяет органы, подверженные морфологическим изменениям и вносит точность в оценку механизма влияния исследуемого лекарственного препарата.

Предоставление итоговых результатов в период осуществления доклинических исследований хронической токсичности всевозможных лекарственных препаратов имеют огромное значение для дальнейшей разработки лекарственных средств, планировании его клинических исследований. Полученные в процессе патоморфологических изучений результаты позволяют определить органы с морфологическими изменениями вследствие токсичного действия препарата, посмотреть динамику и дать необходимый материал для вывода о соотношении риска с пользой. Необходимо четко дифференцировать клеточные и общие морфологические

изменения в тканях, возникшие вследствие воздействия препарата от возможных, половых изменений, изменений в результате развития патологического процесса.

Отбор биологического материала, чистота и точность проведения анализа и пробоподготовка оказывают свое влияние на качество результатов, которые получены в экспериментальных исследованиях. При объяснении результатов необходимо принимать во внимание неустойчивость нормальной и патологической физиологии животных и возможного воздействия на основные параметры в определенных условиях токсикологического эксперимента.

1.3 Особенности пептидов как лекарственных препаратов

Фармакологические препараты пептидной структуры в настоящее время стали привлекать пристальное внимание ученых в области психофармакологии. Число подобных препаратов постоянно растет [5].

Многие исследователи указывают на явные преимущества препаратов пептидной структуры перед классическими синтетическими средствами, среди которых: высокая активность при использовании малых доз препаратов (доли миллиграммов), простота в применении (часто интраназально), отсутствие выраженных нежелательных (побочных) явлений, отсутствие феноменов привыкания, пристрастия (лекарственной зависимости) и отмены при относительно длительном курсе лечения [8, 9].

Несмотря на достоверную информацию, которая указывает на главные биологические функции пептидов, на фармакологическом рынке препараты на их основе представлены в очень небольшом проценте (~1%). К ним относятся:

1. Препараты специфического действия (Церебролизин, Кортексин, Раверон,Тималин)
2. Неспецифического действия (Актовегин, Сайтарин, Рантарин)

3. Препараты гипоталамуса (Сермолерин (соматолиберин), Соматостатин, Протилерин (тиролиберин))
4. Препараты гипофиза (Кортикотропин, Гонадотропин, Интермедин)
5. Препараты паращитовидных желез(Кальцитрин(Кальцитонин))
6. Препараты поджелудочной железы (Препаратыинсулина, Глюкагон)
7. Полусинтетические пептиды (Семакс, Дельтаран, Дисидипин)
8. Синтетические пептиды (Селанк, Ноопепт) [14].

В настоящее время сильно проявился интерес к пептидам, которые обладают нейропротекторным действием. Среди них в последнее время наиболее популярное распространение получили препараты с ноотропным эффектом. Данные лекарственные препараты, способны защитить нервную ткань от агрессивных факторов внешней среды (стрессов, инфекций, токсинов) и/или уменьшать их воздействие на организм. Пептидные препараты используются в клинической практике достаточно не так давно, из которых следует выделитьь органопрепараты (Церебролизин, Кортексин), синтетические пептиды (Семакс, Селанк) и антитела к эндогенным веществам (Танотен). По ранее предоставленным результатам доклинических и клинических исследований данных средств можно судить о том, что пептиды безопасны и эффективны, а полученные из них лекарственные препараты можно свободно применять для лечения пациентов с различными патологиями ЦНС, а также для профилактики этих заболеваний и снижения стресса у здоровых людей [13].

Пептиды – это авторитетный класс лекарств, которые чаще всего вводятся парентеральным путем [26]. Хотя в настоящее время осуществляются разнообразные формы введения, включая пероральный, легочный, интраназальный и трансдермальный пути в соответствии с развитием технологий [21].

Внутривенная инъекция является обычно применяемым способом введения пептидной терапии. Достоинства включают в себя 100% биодоступность, потому как в месте инъекции не осуществляется потери препарата, а также быстрое начало действия. Недостатком является то, что это инвазивно и требует наличие специального медицинского образования.

В последние несколько лет отдается предпочтение интраназальному пути введения, благодаря тому, что доставка лекарственных препаратов осуществляется в системный кровоток и в центральную нервную систему (ЦНС). Слизистая оболочка носа обладает достаточно высокой проницаемостью и высокой степенью васкуляризации в сочетании с предотвращением эффекта первого прохождения действующего вещества через печеночный барьер или разрушения его в желудочно-кишечном тракте обеспечивают высокое системное всасывание лекарственных веществ. Пептидные средства являются достаточно крупными молекулами белковой природы и их абсорбция не осуществляется во время перорального введения, именно из-за этого употребление интраназального пути введение стало распространенным и доступным, даже несмотря на то, что назальная абсорбция пептидов уменьшается с увеличением их молекулярной массы. Барьером для пептидных препаратов, которые превышают молекулярную массу 1000 Да, служит эпителиальный барьер слизистой носовых путей [15].

Легочный путь введения. Легкие являются заманчивым путем введения пептидов благодаря их высокой площади поверхности, высокой васкуляризации и совсем небольшой ферментативной активности. Альвеолы также обладают тонким слоем эпителия (0,1– 0,5 мм) и не обладают дополнительным слоем слизистой оболочки, что может обеспечить быструю абсорбцию и высокую биодоступность вводимых в легкие пептидов [23]. Но жидкость, выстилающая эпителий, слой эпителиальных клеток и эндотелиальная мембрана все еще создают существенно важные абсорбционные барьеры. Пептиды могут вводиться либо в виде жидкости

(распылитель), либо в виде сухого порошка, но в обоих случаях для эффективной доставки пептидов в легкие необходимы устройства-ингаляторы.

Трансдермальный. Легкая доступность кожи делает его желаемым путем для введения пептида, но кожный барьер следует преодолевать различными химическими и физическими средствами. Недавние подходы были сосредоточены в основном на методах ионофореза и микроигл или их комбинации. Микроиглы представляют собой иглообразные структуры микронного размера, которые достаточно длинные, чтобы проникать в роговой слой, но достаточно короткие, чтобы не вызывать болевых ощущений [28]. Микроиглы предлагают четыре различных друг от друга подхода, все из которых были применены к пептидам: 1) предварительная обработка микроиглами с последующим нанесением состава 2) растворяющие микроиглы, которые высвобождают пептид быстро и одновременно с растворением микроиглы; 3) микроиглы с покрытием, высвобождающие их пептидное покрытие; 4) полые микроиглы, позволяющие проводить микроинъекции [22].

В настоящее время увеличивается количество информации о роли пептидов, выступающих в качестве потенциальных модификаторов различных регуляторных процессов в организме. Собраны сведения об их биологической активности. В организме человека пептиды проявляют ряд полезных для здоровья эффектов, включая ноотропное, антиоксидантное, антитромботическое, противомикробное, противоопухолевое и иммуномодулирующее действие. Посредством данных свойств, которые способствуют для улучшения здоровья, биоактивные молекулы, то есть пептиды могут быть добавлены в функциональные продукты питания [15].

Антигипертензивные пептиды — это пептиды, обладающие после высвобождения из исходного белка способностью модулировать ренин-ангиотензиновую систему и регулировать кровяное давление в организме.

Данный гипертензивный эффект уже использовался при создании коммерческих лекарств, и этот эффект демонстрируют ингибирующие АПФ пептиды, которые были выделены из ячменя, чеснока, подсолнечника, желатина и т.д. с использованием β-лактоглобулина, α-лактальбумина, γ-зеина, подобных ферментов.

Антимикробные пептиды - это пептиды, действующие непосредственно для защиты животных от широкого спектра бактерий, грибков, вирусов и простейших, т.е. обладают антимикробной активностью. Пептиды обладают селективной токсичностью по отношению к бактериальным патогенам, не повреждая ткани хозяина. Микробная клеточная стенка состоит из липопротеинов, которые выступают в качестве основной мишени для распада с учетом антимикробной активности пептидов [25]. Антимикробные пептиды в основном и в основном содержат α-спиральную структуру, которые являются катионными и амфипатическими по своей природе, в то время как меньшее количество представляют собой гидрофобные гелевые пептиды. Эта катионная часть пептидов отвечает за электростатическое взаимодействие с анионными фосфолипидами, приводящее к образованию пор в цитоплазматической мембране.

Пептиды с антиоксидантными свойствами были выделены из гороха, сои, льняного семени, рыбы, молочного казеина, молочной сыворотки, яиц и т.д. Они способны индуцировать или принимать участие в реакциях переноса одиночных электронов [19]. Следовательно, считается, что аминокислоты, которые могут переносить электроны при физиологическом pH, способны участвовать в антиоксидантной активности.

Известно о возможности использования пептидов для профилактики рака или злокачественных опухолей (неконтролируемого размножения клеток). Большое количество исследований противоопухолевых свойств пептидов было проведено на луназине, т.е. пептиде, выделенном из сои или злаковых зерен [30]. Данный пептид эффективен против рака, который

вызван химическими и вирусными онкогенами, и работает путем ингибирования гистонацетилтрансферазы, которая дополнительно ингибирует ацетилирование H3 и H4, что приводит к подавлению деления и апоптозу раковых клеток.

Цитомодулирующие и иммуномодулирующие пептиды являются подходящими биологически активными макромолекулами для модуляции иммунного ответа организма. Цитомодулирующие пептиды влияют на жизнеспособность (например, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз) различных типов клеток и вместе с иммуномодулирующими пептидами могут помочь в контроле развития опухоли. Иммуномодулирующие пептиды, с другой стороны, усиливают функции иммунных клеток, улучшают синтез антител и регуляцию цитохрома, а также повышают иммунитет слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [16].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводился на 24 самцах белых беспородных крыс в возрасте около 5-6 месяцев и массой в пределе 290–310 грамм в соответствии с методическими рекомендациями по руководству проведения клинических исследований лекарственных средств [8]. Животные находились в при стандартных условиях лабораторного вивария с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 45–50% и температуре 22-24°С на стандартной полнорационной диете для лабораторных животных ГОСТ Р 50258–92[7].

Перед исследованием крысы были разделены на 4 группы (6 крыс на каждую группу). Животные из контрольных и опытных групп были помещены в разные отсеки. Содержание крыс и условия проведения экспериментов соответствовали ГОСТ 34088–2017«Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» [6].

1. Животные из контрольной группы (Контроль 2) при интраназальном введении получали 10 мкл 0,9%-ного раствора NaCl.
2. Животные из контрольной группы (Контроль 1) при внутрибрюшинном введении получали 1 мл 0,9%-ного раствора NaCl.
3. Животные из опытной группы (Опыт 2) при интраназальном введении получали 1 мл раствора пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа из расчета 100 мкг/кг массы тела.
4. Животные из опытной группы (Опыт 1) при внутрибрюшинном введении получали 1 мл раствора пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа из расчета 500 мкг/кг массы тела.

Введения контрольным и опытным группам 0,9%-ного раствора NaCl и раствора пептидов трутневого расплода интраназально и внутрибрюшинно осуществлялось 1 раз в сутки между 9:00 и 12:00 часами в течение 21 дня. После окончания введения поведение животных оценивали в тестах

«Открытое поле с объектами» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

2.1 Выделение пептидных фракций из трутневого расплода

2.1.1 Ультрафильтрация и ионообменная хроматография для получения пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа

В качестве сырья для получения пептидного препарата выступал трутневой расплод, который был собран в 2022 году. Трутневой расплод хранился в морозильной камере при температуре -18-20°С.

Получение рабочего раствора трутневого расплода проводилось следующим образом: 50 грамм трутневого расплода растворяла в 0,1 литре воды и фильтровала через ватный фильтр для того, чтобы удалить крупные механические элементы, а после пропускала через фильтр «красная лента» на воронке Бухнера. Полученный раствор для концентрирования и разделения на фракции с содержанием пептидов с молекулярной массой 5-10 кДа фильтровала на ультрафильтрационной установке MasterFlex с мембраной Vivaflow:

- первая промывка мембраны от загрязняющих веществ дистиллированной водой;

- промывка 0,5 н раствором NaOH для сапонификации не отмывшихся загрязнителей (0,5-1 объёмов исходного резервуара);

- вторая промывка мембраны от раствора щёлочи и оставшихся загрязняющих веществ тем же объёмом дистиллированной воды.

Полученный концентрированный фильтрат хранился в плотно закрытой стеклянной ёмкости в морозильнике.

Данный принцип ультрафильтрации на установке Vivaflow является фильтрацией в тангенциальном потоке.

В качестве матрицы для ионообменной хроматографии использовалась DEAE-целлюлоза — крупнопористый и слабый анионообменник,

используемый для хроматографии белков и олигонуклеотидов. Ионообменник - это белый сухой мелкозернистый порошок, который следует подвергнуть преформированию и промывке. Преформирование — это необходимая процедура подготовки ионообменников на основе целлюлозы, которые хранятся в сухом виде.

Навеску массой 3 г, к которой приливают большой объем дистиллированной воды и дают настояться в течение суток для набухания. После 24 часов набухания необходимо несколько раз взмутить ионообменник и дождаться, когда гранулы целлюлозы осядут. Частицы, которые не осели, обломки гранул и иной мусор следует удалить декантацией, прилить свежей дистиллированной воды, дать отстояться и снова слить. Эту процедуру повторяют не менее трёх раз и до тех пор, пока поверхность не будет свободна от видимых загрязняющих веществ. Преформирование проводят следующим образом: набухшие гранулы взбалтывают и дают осесть на дно посуды, удаляют верхний слой жидкости максимально и на 45-60 мин заливают 0,5 М раствором HCl для полной ионизации ионогенных групп. После масса ионообменника аккуратно промывается на фильтре или путём нескольких циклов взбалтывания до pH ~ 4. Следующий шаг: заменить ионы Cl^- на исходные OH^- с помощью замачивания в 0,5 М растворе NaOH на 45-60 минут. Далее следует снова промыть ионообменник уже до нейтральных значений pH, закисления или защелачивания промываемой воды происходить не будет.

Использовалась стеклянная колонка, диаметром 1,75 см, объёмом носителя — 6,5 мл. На дно колонки помещался небольшой кружок фильтровальной бумаги для предотвращения вытекания сорбента, после приливалась предварительно взбалтываемая DEAE-целлюлоза. После достижения нужного объёма сорбента столб осевших частиц взбалтывается заключительный раз и после оседания частиц на поверхность сорбента наносился небольшой кружок фильтровальной бумаги для предотвращения

возникновения колебания уровня осевших частиц при нанесении образца. После всех подготовительных операций проводилось хроматографирование с использованием следующих буферных растворов: 0,2 М трис-HCl (pH = 9) и 0,2 М Na–цитратный (pH = 6). Фракции собирались объёмом 2 мл, буфер менялся после пятнадцатой фракции. После сбора фракций колонка уравновешивалась исходным буфером, плотно закрывалась пробкой, чтобы предотвратить закисление угольной кислоты, которая образуется из углекислого газа воздуха и протонов буфера, и хранилась в холодильнике.

Содержание пептидов во фракциях определяли спектрофотометрически при длине волны равной 280 нм, содержание углеводов — реакцией Селиванова.

2.1.2 Определение содержания пептидов и углеводов спектрофотометрическим методом

Спектрофотометрическое определение концентрации пептидов с помощью измерения поглощения при длине волны, равной 280 нм, основано на том, что аминокислоты триптофан и тирозин, входящие в состав большинства пептидов и белков, поглощают на длинах волн 279 нм и 274 нм соответственно. Вклад в общее поглощение фенилаланина сравнительно мал.

Для измерения концентрации исследуемый раствор заливался в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и измерялось оптическое поглощение при длине волны λ = 280 нм против контроля (чистый растворитель). По полученным результатам строился профиль элюции пептидов после проведения хроматографии. Также показатели поглощения использовались для определения концентрации с помощью метода калибровочной кривой в пределах концентраций от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, используемый стандарт белка — бычий сывороточный альбумин.

В качестве реакции для определения наличия углеводов в пробе использовалась реакция Селиванова. Эта реакция качественная только для

фруктозы или других кетоз, которые являются маркёрами наличия углеводов в пробе. Реакция основана на образовании фруктозы с крепкой соляной (или другой минеральной) кислотой оксиметилфурфурола, который с резорцином даёт вишнёво–красное окрашивание.

Из каждой фракции после ионообменной хроматографии отбиралась аликвота объёмом 0,5 мл, к которой добавлялся 0,1%-й спиртовой раствор резорцина в количестве 0,5 мл и 1,5 мл 30% HCl, после чего смесь ставилась в кипящую водяную баню для инкубации на 8 минут. Интенсивность окраски измерялась на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете толщиной 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 490$ нм. По полученным значениям оптической плотности был составлен график.

2.2 Физиологические тесты для оценки ноотропной активности. Тест «Открытое поле»

Одна из экспериментальных методик, используемая для оценки тревожного поведения животных, - это тест открытое поле (Open Field Test).

Открытое поле заключается в наблюдении за компонентами поведения животного после того, как оно будет выпущено в незнакомую для него среду. Роль таковой выполняет хорошо освещенная арена, в пределы которой животное никогда раньше не попадало и которая значительно превосходит по размерам его домашнюю клетку. Модифицированная версия открытого поля предусматривает добавление новых объектов на арену и количественное определение времени, которое животное затрачивает на посещение и изучение всех объектов.

Установка для открытого поля представляет собой хорошо освещенную круглую арену 1,5 м в диаметре, окружённую стенкой высотой 45 см. Арена разделена на сектора радиальными и круговыми линиями и имеет сквозные отверстия.

Выбор формы установки обусловлен психологией животных, так как

поведение крысы в незнакомой среде будет сильно зависеть от условий этой среды, включая размеры пространства, наличие или отсутствие убежищ, достатка освещения и т.д. Углы в случае квадратного или прямоугольного полей могут быть выбраны животным в качестве укромных мест, что будет влиять на ход эксперимента и приведет к загрублению результатов, особенно в случае небольших опытных групп. Поэтому наиболее оптимальной является круглая арена. Размеры арены так же могут влиять на погрешность исследования, так как и в случае слишком больших, и в случае слишком маленьких площадей наблюдаются слишком различные, не интерпретируемые типы поведения от «затаивания» до «гиперактивности», что обусловлено индивидуальными особенностями животных. Для получения относительно однородных результатов предпочтительно использовать арену средних размеров.

При помещении крыс в незнакомую обстановку животные испытывают естественный страх. Показателями поведения животных являются:

1. Горизонтальная активность в центре арены и у периферии,
2. Стойки на задних лапах,
3. Интерес к отверстиям на поверхности арены,
4. Фризинг – замирание без движения,
5. Груминг – гигиенические процедуры [23].

2.3 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Методика основана на предпочтении грызунами темных нор, естественного страха нахождения на открытых площадках и падения с высоты. Описание и оценка метода наиболее подробно представлены в работах [10, 11, 12, 15, 16].

Распространенным вариантом приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) служит установка, состоящая из крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом 4-х рукавов: два

противоположных, открытых, без стенок, и два закрытых, темных. Центральная площадка и пол открытых рукавов, как правило, прозрачны, тогда как пол и стенки закрытых рукавов покрашены в темный цвет. Эксперименты проводятся как при обычном освещении, так и при дополнительном освещении открытых рукавов. Наиболее часто используемые размеры ПКЛ для крыс: рукава 10×10×50(60) см, центральная площадка 10×10×10 см, ПКЛ приподнят на 80–100 см; для мышей рукава составляют 5×5×20 (25) см, центральная площадка — 5×5×5 см, ПКЛ приподнят на 25(30) см. Перед началом тестирования животных выдерживают (от 3-х до 5-ти мин) в темных клетках. Затем животное помещают в ПКЛ на центральную площадку, головой к открытому рукаву и в течение определенного интервала времени (5 мин или 5+5 мин, или 3+3 мин, или поминутно 5 мин) регистрируют время пребывания животных в открытых, закрытых рукавах, а также на центральной площадке, количество заходов в открытые и закрытые рукава, латентный период первого захода в открытый рукав, число свешиваний с открытых рукавов. Контрольные животные предпочитают большую часть времени проводить в закрытых, темных рукавах. Ноотропный эффект препарата оценивается по увеличению числа заходов в светлые рукава и времени нахождения в них, без увеличения общего числа заходов и по числу свешиваний с открытых рукавов. Время нахождения на центральной площадке позволяет оценить показатель принятия решения. По общему числу заходов в открытые и закрытые рукава и вертикальным стойкам можно оценить общую двигательную активность. Эмоциональность крыс оценивается также по числу мочеиспусканий и болюсов. В некоторых исследованиях используется приподнятый zero-лабиринт, который представляет собой кольцевую приподнятую платформу с чередуемыми двумя открытыми и двумя закрытыми четвертями круга.

2.4 Статистическая обработка данных

Для всех количественных данных были рассчитаны средние арифметические значения по группам и стандартные квадратичные ошибки.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием с программы Microsoft Office Excel 2003. Анализ проводился отдельно для каждой группы. Статистическая значимость различий выявлялась при использовании уровня значимости $p \leq 0,05$. Наблюдались тенденции к различиям при уровне значимости $p \leq 0,1$ с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок и непараметрического U- критерия Манна-Уитни.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема выделения, очистки пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа представлена на рисунке 2.

Рисунок 2. Общая схема выделения, очистки и разделения пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа

Раствор трутневого расплода, отфильтрованный на установке VivaFlow, представляет собой смесь низкомолекулярных веществ, включая пептиды с молекулярной массой 5-10 кДа, углеводы, фенолы, пигменты и другие мелкие молекулы. Биологическая активность такого раствора может быть обусловлена как свойствами отдельных его компонентов, так и синергическим взаимодействием совокупности веществ.

Для более глубокой очистки пептидных фракций от примесей использовался метод ионообменной хроматографии.

3.1 Очистка от углеводов и разделение белков и пептидов методомионообменной хроматографии

Для проведения очистки пептидов трутневого расплода от углеводов, необходимо для начала определялся достаточный наносимый объем раствора трутневого расплода, чтобы конечный выход пептидных продуктов был оптимален. Для этого важно, чтобы осуществлялась хроматография с пробным объемом 0,75; 0,5 и 0,35 мл без каких-либо правок параметров колонки. Профили элюции представлены на рисунках 3,4,5.

Экспериментально было установлено, что во время использования наносимой пробы объёмом в 0,75 мл выход очищенных пептидов после очистки очень мал для будущих анализов, в то время как количество непрореагировавших пептидных молекулс обменником велико.

Оптимальным объёмом было принято данное в 0,5 мл, при котором наблюдается относительное равенство между связавшимися и непрореагировавшими пептидами, а при объеме в 0,35 мл выход пептидов очень низок.

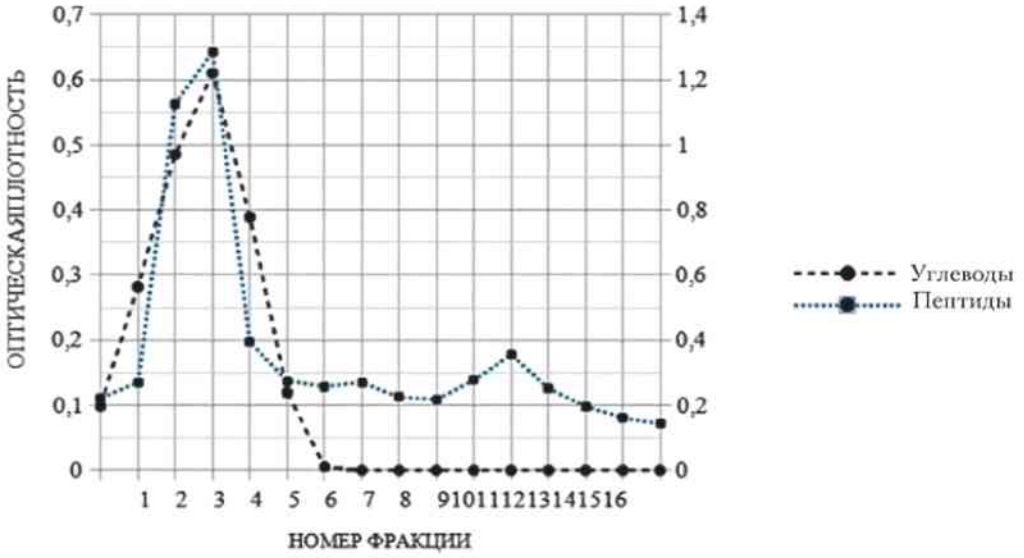

Рисунок 3. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,75 мл по оптической плотности

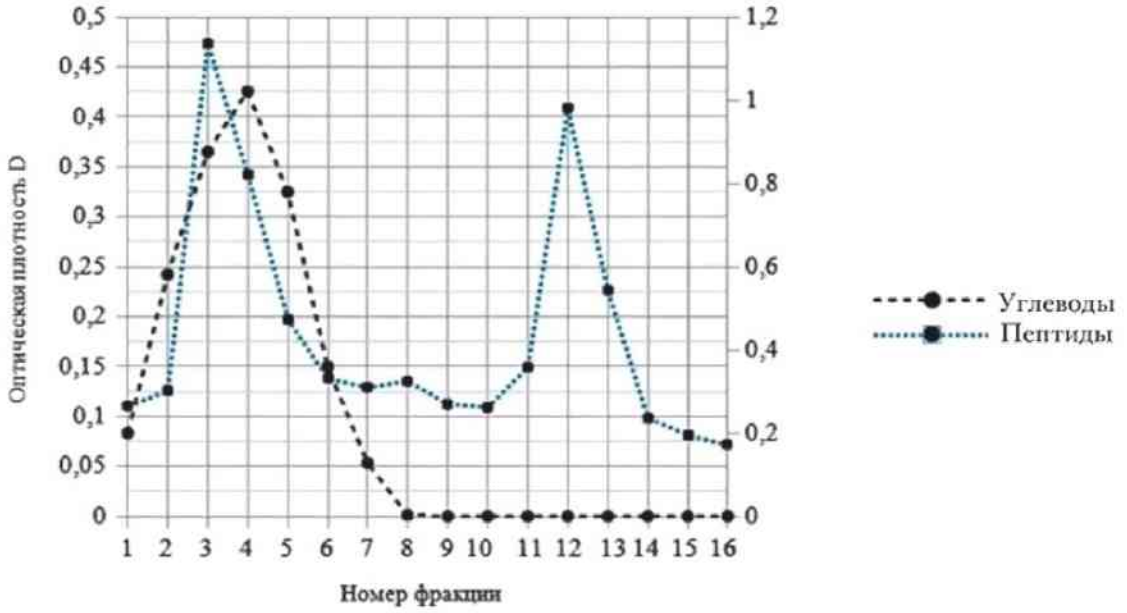

Рисунок 4. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,5 мл по оптической плотности

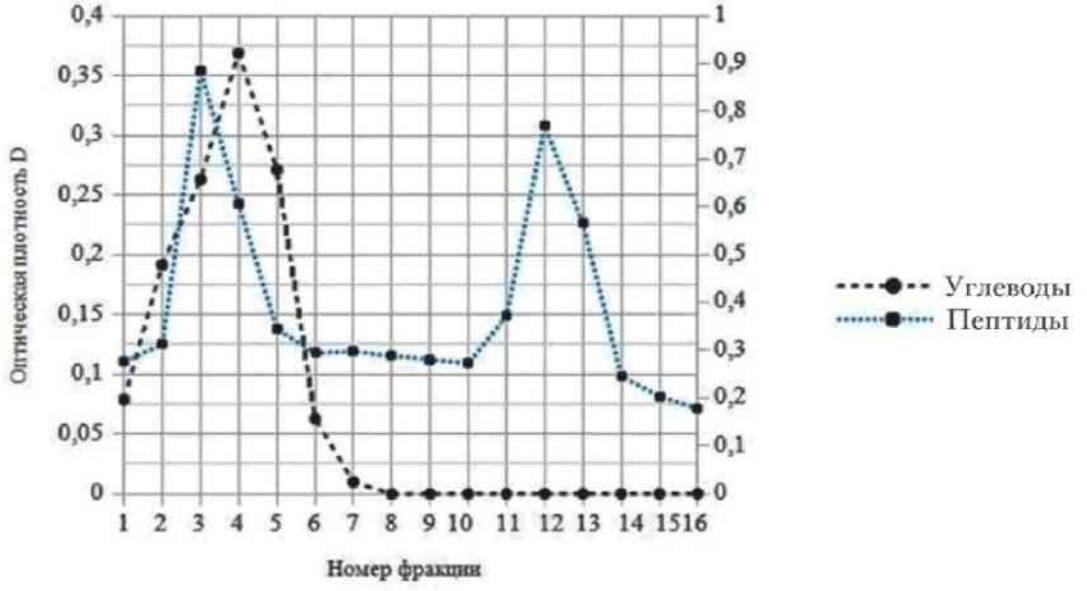

Рисунок 5. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,5 мл по оптической плотности

На основе полученных данных оптических плотностей, используя калибровочную кривую, были вычислены концентрации пептидов в каждой из фракций, для того, чтобы подсчитать количество выхода белков и пептидов трутневого расплода после того, как их очистили от углеводов с помощью метода ионообменной хроматографии. Профили элюции по концентрации показаны на рисунках 6,7 и 8.

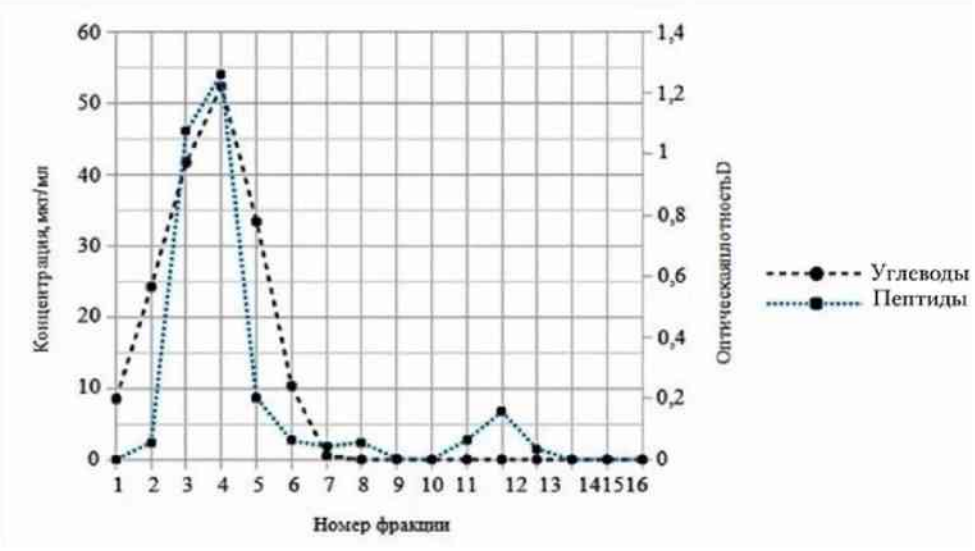

Рисунок 6. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,75 мл по концентрации пептида

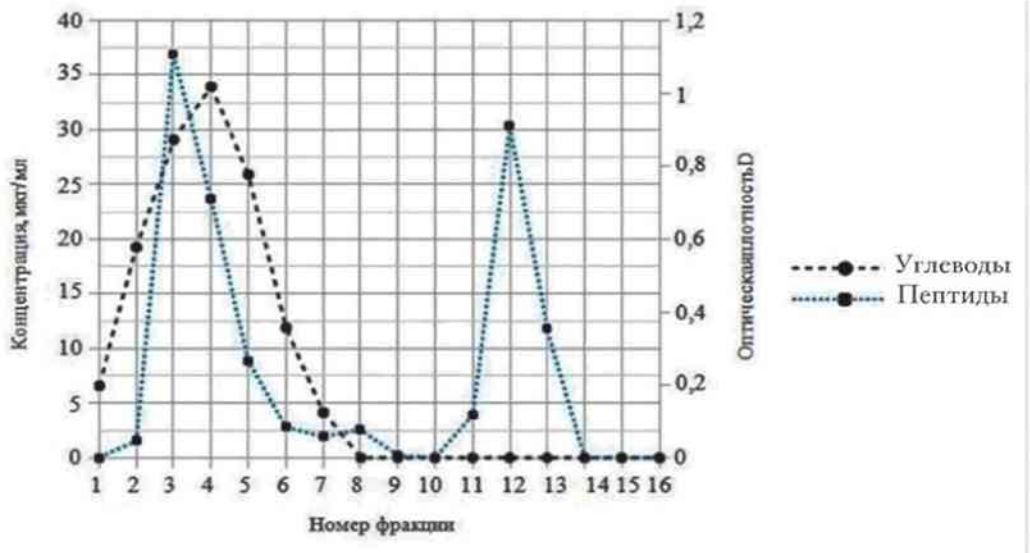

Рисунок 7. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,5 мл по концентрации пептида

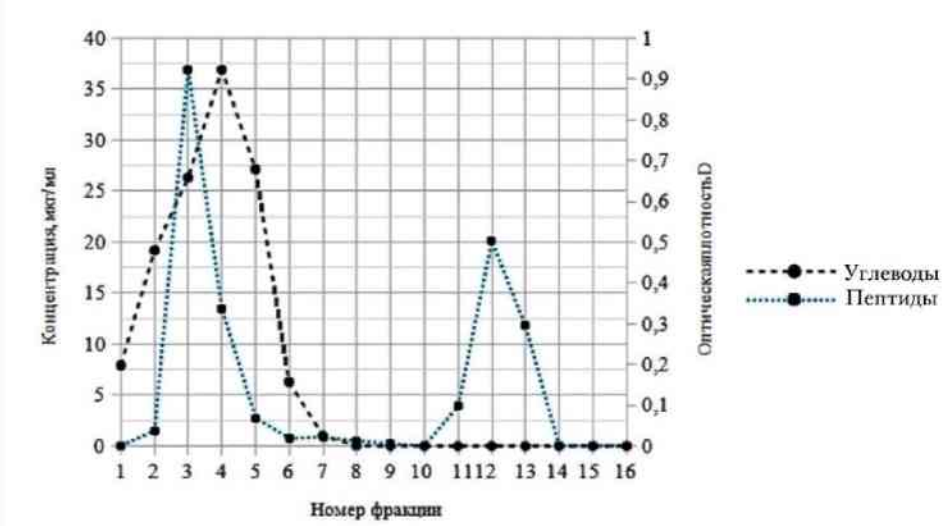

Рисунок 8. Профиль элюции при наносимой пробе в 0,35 мл по концентрации пептида

Определение выхода пептидных продуктов после хроматографии осуществлялось с помощью оптической плотности и концентрации. Концентрация рассчитывалась при использовании калибровочной кривой, построенная по данным разведений БСА.

Дальнейшая очистка пептидов и белков от углеводов была выполнена при постоянных параметрах хроматографический системы: высота ионообменного столба составляла 6,5 см, диаметр колонки — 1,75 см. Элюция первых 8 фракций проводилась начальным буфером (0,2 М трис-HCl, pH = 9), а десорбция закрепившихся белков во фракциях с 9 по 16 осуществлялась вторым буферов (0,2 М Na–цитратный, pH = 6).

3.2 Результаты распознавания новых объектов животными в тесте «Открытое поле»

Проведение анализа поведения животного предполагает изучение движений животного в процессе решения специфических задач, с целью получить наиболее точное представление о его исследуемых психических качествах.

В методике распознания новых объектов животными с помощью теста

«Открытое поле» были получены результаты, которые отображают воздействие режимов поведенческих информаций у крыс: горизонтальная и вертикальная двигательная активность, обследование отверстии и психоэмоциональные проявления: фризинг, груминг, а также уровень дефекаций.

Результаты исследования крысами объектов 1 и 2 представлены на рисунке 9.

Рисунок 9. Объекты 1и 2, изучаемые животными в тесте «Открытое поле с объектами»

Результаты исследования ГДА представлены на рисунке 10.

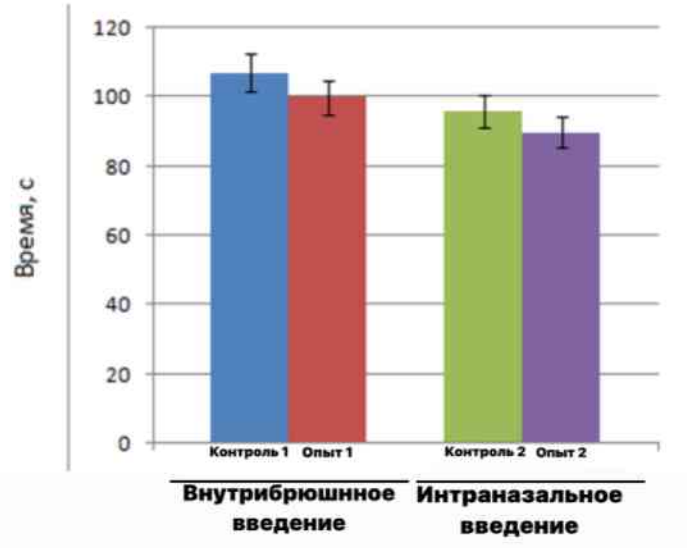

Рисунок 10. ГДА с объектом

По горизонтальной двигательной активности можно судить, что чем больше секторов в поле пересекло животное, тем менее тревожно его состояние. При этом состояние ожидаемой опасности характеризуется двигательным напряжением и симпатическойгиперактивностью.

По результатам эксперимента можно судить о том, что как при внутрибрюшинном, так и при интраназальном введении по сравнению с контрольными группами животных, пептидный препарат трутневого расплода не оказывает никаких эффективных воздействий.

Результаты ВДА представлены на рисунке 11.

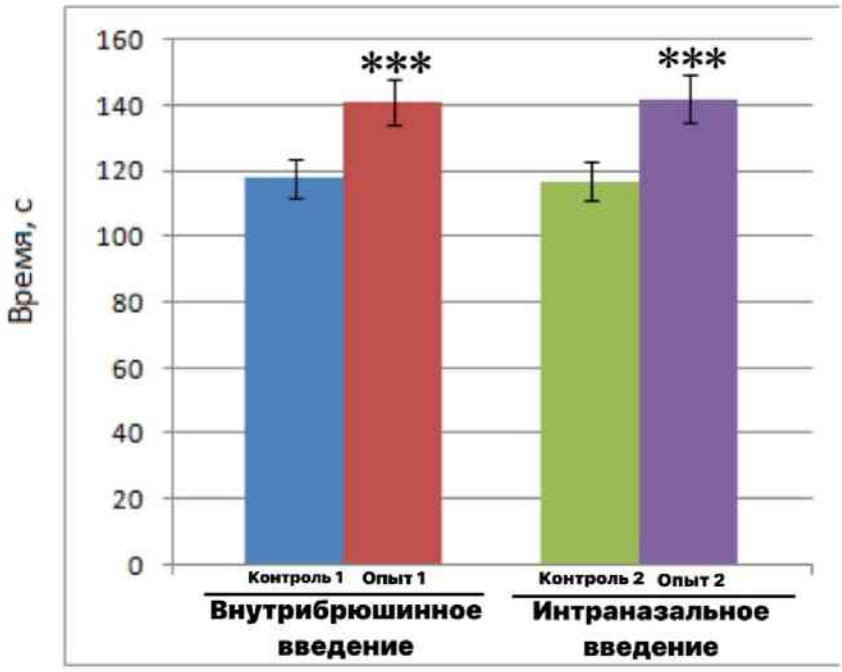

*Рисунок 11. ВДА с объектом. (Примечание. ***– p <0,5 по сравнению с контролем)*

Вертикальная двигательная активность (ВДА) животных в открытом поле оценивалась в виде двух стоек: Climbing (когда задние лапы остаются на полу, а передние упираются в стенку поля) и Rearing (когда животное остается на весу, поднимаясь на задние лапы). Для анализа результатов была

использована общая ВДА, учитывая оба вида стоек. Это позволило получить наиболее полное представление о вертикальной активности животных в открытом поле.

Результаты показали, что при длительном интраназальном введении пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа наблюдается увеличение вертикальной двигательной активности на 23% по сравнению с контрольной группой. При внутрибрюшинном введении пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня наблюдается увеличение вертикальной двигательной активности на 24,5% по сравнению с контрольной группой.

Увеличение вертикальной двигательной активности свидетельствует о повышении познавательной деятельности и спокойном эмоциональном состоянии, что наблюдается при обоих путях введения пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа.

Результаты исследования в центре арены в тесте «Открытое поле с объектами» представлены на рисунке 12.

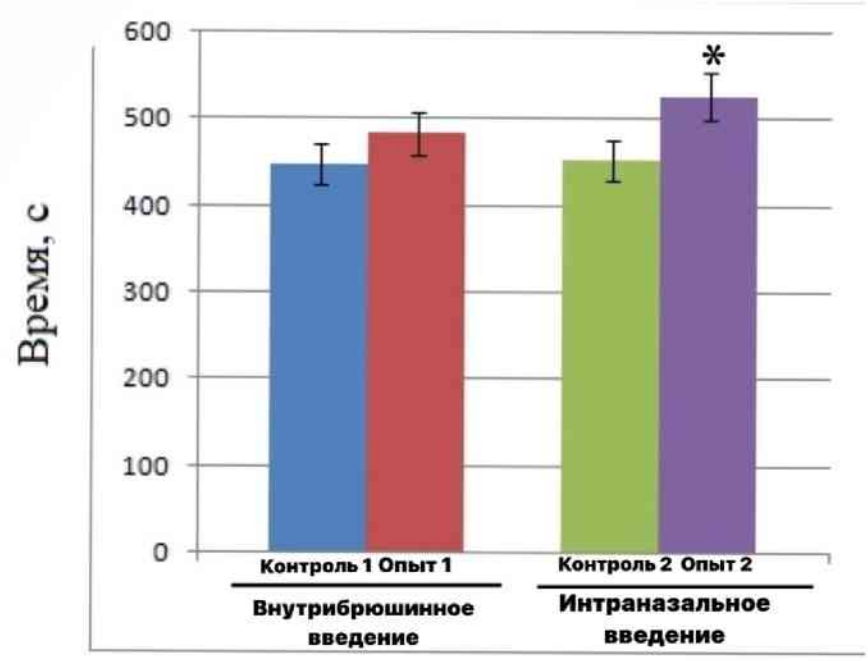

*Рисунок 12. Результаты выходов животных в центр арены с объектами. (Примечание. * – p <0,05 по сравнению с контролем)*

После интраназального введения пептидных фракций выход животных в центр арены поля из опытной группы увеличился на 11% по сравнению с животными контрольной группы.

Выход в центр арены является одним из проявлений способности животных исследовать открытое поле. Чем больше животные находятся в центре площадки, тем сильнее снижается уровень тревожности и увеличивается способность к изучению новой территории.

Исходя из результатов теста «Открытое поле с объектами» после внутрибришинного и интраназального введения пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа часто наблюдались Climbing и Rearing во время ВДА, а также увеличились выходы животных в центр арены, что доказывает наличие ноотропного эффекта пептидов трутневого расплода.

3.3 Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В ходе эксперимента контрольные группы животных отдавали предпочтение находиться большую часть времени в закрытых, темных рукавах. Поведенческая оценка животных давалась по увеличению числа заходов в рукава и времени нахождения в них, общему числу времени горизонтальной двигательной активности (ГДА) и вертикальной двигательной активности ВДА. Эмоциональность крыс оценивалась также по числу мочеиспусканий и болюсов.

Результаты поведения животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» представлены на рисунке 13.

Рисунок 13. Животные в закрытых рукавах в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Результаты исследования груминга представлены на рисунке 14.

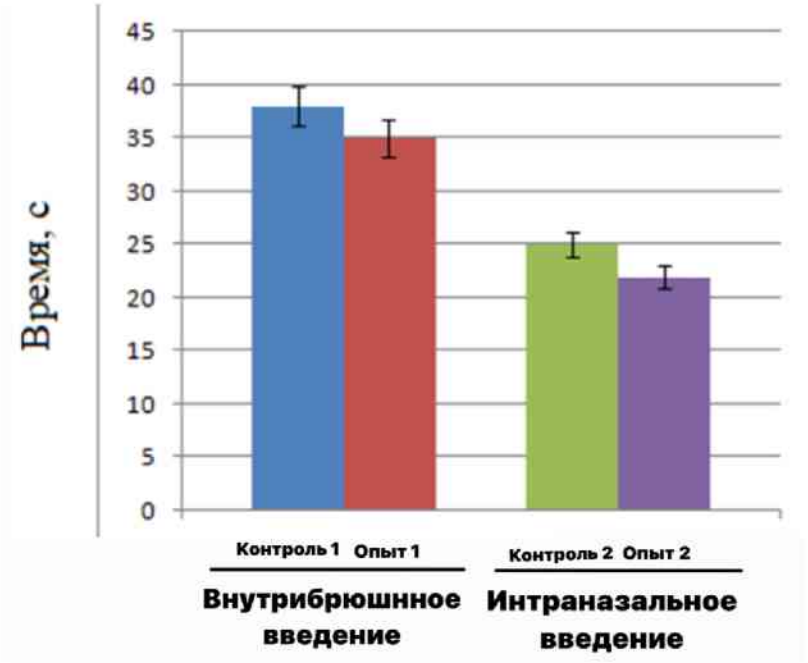

*Рисунок 14. Груминг в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». (Примечание. * – p <0,05 по сравнению с контролем)*

После продолжительного интраназального и внутрибрюшинного введения пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-

10 кДа по сравнению с контрольными группами достоверные изменения груминга не наблюдаются. Это говорит нам о том, что не происходит регуляции эмоционального состояния и процессов возбуждения.

Сравнение различных путей введения пептидов показало, что при внутрибрюшинном введении груминг выше на 37% по сравнению с интраназальным введением. Животные более устойчивы к новой обстановке, поэтому у них чаще наблюдаются периоды длительного и короткого груминга, и снижается уровень стресса.

Результаты исследования количества стоек животных в рукавах представлены на рисунке 15.

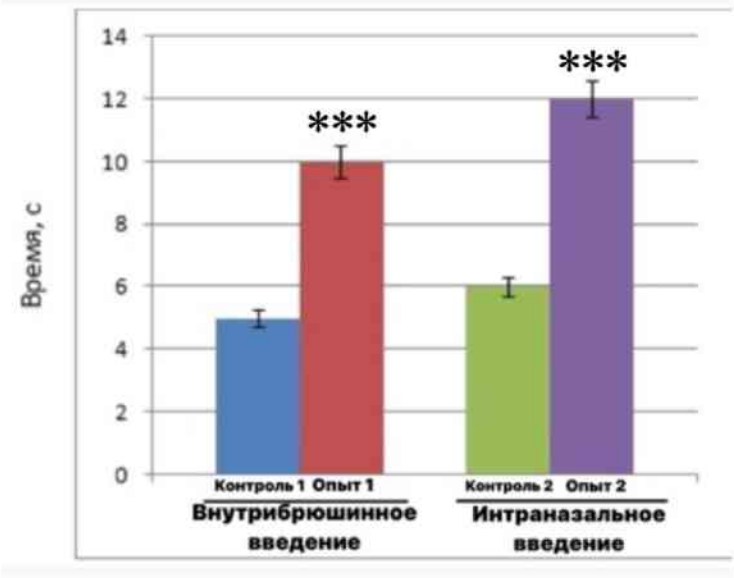

*Рисунок 15. Количество стоек в открытых и закрытых рукавах в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». (Примечание. *** – p <0,5 по сравнению с контролем)*

Длительное интраназальное введение животным пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа привело к увеличению количества стоек в рукавах в два раза. При внутрибрюшинном введении пептидных фракций животным из опытной группы, также отмечается увеличение количества стоек в два раза по сравнению с контрольной группой.

Количество стоек в рукавах является показателем способности

животных запоминать информацию и концентрировать внимание.

Результаты исследований ГДА в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» представлены на рисунке 16.

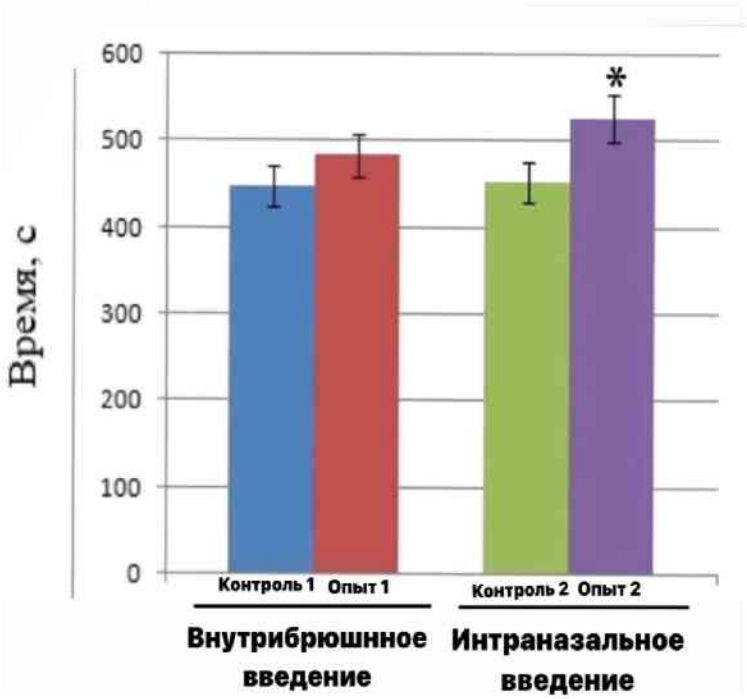

Рисунок 16. Результаты ГДА в закрытых и открытых рукавах.

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

При регулярном интраназальном введении пептидных фракций горизонтальная двигательная активность увеличилась на 15% по сравнению с контрольной группой.

Следовательно, у животных после введения пептидов с молекулярной массой 5-10 кДа трутневого расплода увеличиваются когнитивные функции и происходит стимуляция умственной деятельности животных.

Исходя из результатов теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» после интраназального введения пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа наблюдается снижение стресса, повышение умственной работоспособности, концентрация внимания, что является прямым доказательством ноотропного эффекта пептидных фракций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы было изучено наличие ноотропного эффекта пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа, при введении лабораторным животным интраназально и внутрибрюшинно в течение 21 дня.

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что метод выделения пептидов из трутневого расплода 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. Данные методы обладают возможностью автоматизации и масштабирования, широко доступны.
2. Обнаружено, что внутрибрюшинное и интраназальное введение пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к изменению поведения животных в тесте «Открытое поле с объектами», а именно к достоверному увеличению: вертикальной двигательной активности и выходов в центр арены по сравнению с контролем.
3. Обнаружено, что интраназальное введение пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к изменению поведения животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», а именно к достоверному увеличению: количества стоек в рукавах лабиринта и горизонтальной двигательной активности по сравнению с контролем. Внутрибрюшинное введение пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к изменению поведения животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», а именно к увеличению груминга.
4. Выявлено, что изменения данных показателей поведения в тестах

«Открытое поле с объектами» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» свидетельствуют о наличии ноотропного эффекта пептидных фракций трутневого расплода при интраназальном введении. Внутрибрюшинное введение не приводит к выраженному ноотропному эффекту.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурчинский С. Г. Новые возможности ноотропной и вазотропной фармакотерапии в стратегии лечения цереброваскулярной патологии / С. Г. Бурчинский // Международный неврологический журнал.2011. №2. С. 14-17

2. Всемирная организация здравоохранения: сайт. 2020. URL https://www.who.int/ru/ (дата обращения: 15.04.2020).

3. Ганцгорн Е. В Патофизиологические основы современной фармакотерапии острой ишемии головного мозга. Место ноотропов и антиоксидантов в нейропротекции / Е. В. Ганцгорн, Д. П. Хлопонин, Ю. С. Макляков // Медицинский вестник Юга России. 2013. №2. С. 4-12.

4. ГОСТ Р 50258–92 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных.Технические условия. Москва: Московский печатгник,1994,24с

5. Евтушенко И. С. Ноотропы и нейропротекторы в современной клинической нейрофармакологии / И. С. Евтушенко // Международный неврологический журнал. 2013. №3 (57). С. 20-27.

6. Илларионова Т. С. Место Фенотропила среди ноотропных препаратов / Т. С. Илларионова // Трудный пациент. 2006. Т. 4. №5. С. 23-26.

7. Кательникова А.Е. , Крышень К.Л., Зуева А.А., Макарова М.Н. Интраназальное введение лекарственных средств лабораторным животным./ А.Е. Кательникова, К.Л. Крышень, А.А. Зуева, М.Н. Макарова.// Лабораторные животные для научных исследований.
2019. № 2. с. 1-2.

8. Косарев В. В. Фармакотерапия дисциркуляторной энцефалопатии: в фокусе - ноотропы / В. В. Косарев, С. А. Бабанов // Медицинский совет. 2012. №3. С. 54-59.

9. Миронов А.Н, "Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств",М:Гриф и К, 2015, 592 с

10. Миронов А.Н., БунатянН.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, ч1, Москва,2012

11. Регистр лекарственных средств России: сайт.2020-2021.URL https://www.rlsnet.ru/ (дата обращения 17.09.2020).

12. Сорокина И. Б. Патогенетические направления терапии хронической цереброваскулярной недостаточности / И. Б. Сорокина // Медицинский совет. – 2011. – №3-4. – С. 101-103.

13. Усенко Л. В. Когнитивные нарушения после общей анестезии при экстракардиальных вмешательствах и эффект раннего введения тиоцетамав послеоперационном периоде / Л. В. Усенко, И. С. Полинчук // Международный неврологический журнал. 2011. №6. С. 65-69.

14. Шабанов П. Д. Адаптогены и антигипоксанты / П. Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2003. №3. С. 50-81.

15. Шилова И. В. Химический состав растений Сибири и разработка ноотропных средств на их основе: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук: 14.04.02, 14.03.06 / Шилова Инесса Владимировна. Томск, 2011. 512 с.

16. Chughtai M. F. J., Mehmood T., Liaqat A., Khaliq A.Bioactive Peptides; Physiological Benefits and Commercial Applications./ M. F. J. Chughtai, T. Mehmood, A. Liaqat, A. Khaliq. // Dairy and Vet Sci J. 2019. № 12 (2). pp.1-2.

17. Danquah M.K, Agyei D. M.K. Danquah, D. Agyei. Pharmaceutical applications of bioactive peptides./ M.K. Danquah, D. Agyei. // Medical Biotechnology 2012. № 1 (2). p.5.

18. Gary Walsh. Pharmaceutical biotechnology : concepts and applications. 2007. 499 p.

19. Honek J. Preclinicalresearch in drug development./ J. Honek.// Communications Consulting & Medical Writing. 2017.– Vol.26. № 4. – pp.5-7.

20. Huang D, Ou B, Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays./ D. Huang, B. Ou, R.L. Prior. //J Agri Food Chem. 2005. № 53 (6). pp.1842-1845.

21. 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.

22. Illum L. Nasal drug delivery - recent developments and future prospects. / L. Illum// J Control Release –2012. Vol.2. –№ 161. pp.254-255.

23. Kovalainen M., Mönkäre J., Riikonen J., Pesonen U., Vlasova M, Salonen J., Lehto V., Järvinen K., Herzig K. Novel Delivery Systems for Improving the Clinical Use of Peptides / M. Kovalainen, J. Mönkäre, J. Riikonen, U. Pesonen, M. Vlasova, J.Salonen, V. Lehto, K. Järvinen, K. Herzig. Kovalainen M., Mönkäre J., Riikonen J., Pesonen U., Vlasova M, Salonen J., Lehto V., Järvinen K., Herzig K.// Article in Pharmacological Reviews 2015. № 67. pp.547-548.

24. Patton J.S., Byron P.R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs./ J.S.Patton, P.R. Byron.// Nat Rev Drug Discov. 2007. №6. pp.67-71.

25. "Preclinical Psychopharmacology" by Royce L. Johnson and M. Foster Olive

26. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides./ Y. Shai. // Biomembrane. 1999. Vol.1452. № 1. pp.57-60.

27. Siddiqui O., Chien Y.W. Nonparenteral administration of peptide and protein drugs./ O. Siddiqui, Y.W. Chien // Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1987. Vol.3. № 3. pp. 196-197.

28. 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.

29. Van der Maaden K., Jiskoot W., Bouwstra J. Microneedle technologies for (trans) dermal drug and vaccine delivery./ K. van der Maaden, W. Jiskoot, J. Bouwstra J.// J Control Release 2012. Vol.2. № 161. pp.645-647.

30. Venkatesan N, Ramanathan M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery./ N.Venkatesan, M. Ramanathan.// Pharmacovigilance and Pharmacoepidemiology. 2017. Vol.1. №1. pp.6-7.

31. Wang J., Hu J., Cui J., Bai X., Du Y., Miyaguchi Y., Lin B. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats./ J. Wang, J. Hu, J. Cui, X. Bai, Y. Du, Y. Miyaguchi, B. Lin. //Food Chem. 2008. № 111 (2). p.303-307.

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. Preclinicalresearch 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 acidargic 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., Gonza´lez-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.