

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 06.04.01 Биология

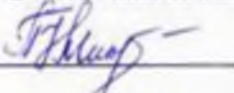
Магистерская программа Биохимия

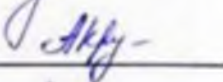
Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«НООТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ ТРУТНЕВОГО
РАСПЛОДА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 5-10 кДа»

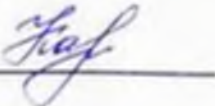
Студент  Митронькина Карина Владимировна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Рецензент  Невитов М.Н.

Нормоконтролер  Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 21.05.25 № 12)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 27.06.16 № 5)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1. Ноотропные лекарственные средства в современной медицине.....	5
1.2. Доклинические исследования ноотропных лекарственных препаратов	12
1.3. Пептидергическая система мозга.....	16
1.4. Карбоксипептидаза Е как ключевой фермент обмена регуляторных пептидов.....	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1. Методы выделения и очистки пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа.....	23
2.2. Методы изучения ноотропной активности пептидов в тестах <i>in vivo</i> ...	26
2.2.1. Тест «Открытое поле с объектами»	27
2.2.2 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»	28
2.2.3 Определение активности карбоксипептидазы Е	30
2.3. Статистическая обработка данных	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	32
3.1. Результаты очистки пептидов от углеводов методом ионообменной хроматографии	33
3.2. Результаты теста «Открытое поле с объектами».....	37
3.3. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт».....	41
3.4. Влияние пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа на активность карбоксипептидазы Е.....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	54

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 нейрометаболическими нарушениями в центральной нервной системе.

Было доказано, что стресс – это фактор риска большинства сердечно-сосудистых заболеваний, оказывающий негативное воздействие на нервную систему, впоследствии чего у человека ухудшается память, снижается работоспособность, искажается восприятие и ухудшаются процессы мышления. Исходя из этого, следует искать и разрабатывать различные варианты путей для профилактики и коррекции отрицательного воздействия стресса на нервную систему.

С точки зрения фармакологии для коррекции когнитивных нарушений используются ноотропы, как лекарственные препараты. Как влияют такие препараты на метаболические процессы, можно определить путем биохимических тестов, в том числе путём анализа изменений показателей пептидергической системы.

Данные исследования необходимы для разработки и оценки эффективности новых лекарственных препаратов для комплексной фармакотерапии и фармакопрофилактики заболеваний неврологического профиля.

Современные лекарственные препараты с ноотропной активностью не всегда соответствуют требованиям клинической фармакологии. Причиной является значительное число побочных эффектов. К таким эффектам относят: повышенную раздражительность, головокружение, парасомнию, экстрапирамидные расстройства, диспепсию, гепатотоксические действия, побочные воздействия с позиции сердечно-сосудистой системы и остальные,

лимитирующие их применение.

Продукты пчеловодства обладают потенциалом в качестве ноотропных биологически активных добавок. Данные продукты в преобладающей части случаев нетоксичны и могут быть использованы в качестве препаратов для эффективного повышения когнитивных функций.

Цель работы: изучить и оценить наличие ноотропной активности пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое поле с объектами» и провести анализ влияния пептидных фракций трутневого расплода на активность карбоксипептидазы E – ключевого фермента обмена регуляторных пептидов в мозге крыс.

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»;
3. Оценить поведение лабораторных животных в тесте «Открытое поле с объектами»;
4. Провести обработку результатов и оценить наличие ноотропной активности пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа;
5. Определить активность фермента карбоксипептидазы E в отделах мозга крыс.

Магистерская диссертация написана на 61 листе, содержит 13 рисунков, 9 таблиц и список литературы на английском и русском языках из 77 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ноотропные лекарственные средства в современной медицине

Термин «ноотроп» был введён в 1972 г., через два года после выхода на мировой рынок препарата «Пирацетам» [1]. К ноотропным препаратам относятся лекарственные вещества, улучшающие работу мозга, повышающие активность и когнитивные функции людей с заболеваниями нервной системы, улучшающие концентрацию внимания и память у здоровых людей [4]. Побочные эффекты препаратов могут быть связаны с индивидуальной реакцией организма, например, эритема, головокружение, тошнота, головные боли и др. Как правило не вызывают психомоторного возбуждения и привыкания [7].

Разнообразие химического строения ноотропных препаратов обуславливает наличие различий в механизмах их действия [5]. На данный момент времени общепринятая классификация ноотропов отсутствует, примеры лекарственных средств, относящихся к данной группе препаратов представлены в таблице 1.

Таблица 1 Лекарственные средства, относящиеся к группе ноотропных препаратов

Фармакологическая группа	Примеры
Пирацетам, его гомологи и аналоги	Анирацетам, оксирацетам, прамирацетам, нефирацетам и др.
Производные диметиламин этанола	Деанолаацеглюмат, меклофеноксат, центрофеноксин
Препараты нейроаминокислот	ГАМК и её производные: фенибут, гопантенвая и глутаминовая кислота, глицин

Таблица 1 Продолжение

Производные пиридоксина	Пиритинол (пиридитол, энербол, энцефабол)
Холиномиметик центрального действия	Холина альфосцерат
Препараты Ginkgo biloba	Билобил, мемоплант, танакан и др.

Одновременно с истинно ноотропными препаратами другие авторы относят к данной группе препараты с большим разнообразием эффектов [2]:

1) препараты, которые увеличивают мозговое кровообращение, микроциркуляцию и метаболизм: винпоцетин, винкамин, винконат, ницерголин, циннаризин, флунаризин, нимодипин, ксантиновые производные пентоксифиллина, карнитин, фосфатидилсерин, натрия оксибат; витамины и их производные: пантотеновая кислота, фолиевая кислота, витамин Е;

2) промежуточные продукты метаболизма клетки: оротовая и янтарная кислоты;

3) комбинированные препараты: инстеон, омарон [18].

Большое количество работ посвящено изучению пирацетама (ноотропила, пирамема и др.), который до настоящего времени остаётся "эталонным" ноотропным препаратом [10].

Механизм действия пирацетама связан с изменением метаболических, биоэнергетических процессов в нервной клетке, повышением скорости оборота информационных макромолекул и активацией синтеза белка.

Пирацетам оказывает влияние на утилизацию кислорода и обмен глюкозы. Эффекты препарата зависят от условий в клетке. При аэробных условиях препарат усиливает поглощение кислорода и гликолиз приблизительно на 30%. В условиях гипоксии данный препарат приводит к активации пентозофосфатного пути с образованием НАДФ•Н - важнейшего метаболита для мозгового обмена веществ [24].

Кроме того, в условиях гипоксии пирацетам увеличивает синтез аденозинтрифосфата (АТФ), кругооборот АТФ - цАМФ в нейроне. Уровень лактата при этом не повышается. Индукция пирацетамом пентозафосфатного пути и синтеза аденилаткиназы также, вероятно, в конечном итоге ведет к улучшению утилизации кислорода в головном мозге [22].

В процессе применения ноотропила происходит увеличение или активация фосфолипаз с повышением обмена фосфатилхолина и фосфатидилэтаноламина, белкового синтеза, а также синтеза и кругооборота цитохрома b5. При этом пирацетам увеличивает текучесть мембраны при старении и ингибирует процессы перекисного окисления липидов [39].

По своей химической структуре пирацетам можно рассматривать как циклическое производное ГАМК, но согласно данным фармакокинетического исследования препарата, циклическая часть его молекулы не подвергается разрыву с образованием ГАМК, которая могла бы оказывать прямой эффект. В связи с этим у пирацетама не обнаружены собственные участки связывания и аффинитет к большинству известных рецепторов: $\alpha 1$ -, $\beta 2$ - и β -адренорецепторов, мускариновых, серотониновых, опиатных, дофаминовых, аденозиновых и бензодиазепиновых [38].

Пирацетам увеличивает сопряжение между глутаматными рецепторами и фосфолипазой C, а также вызывает рост максимальной чувствительности специфических сайтов для 3Н АМРА в синаптических мембранах коры мозга крыс [39].

Кроме того, у пирацетама выявлена способность влиять на N-метил-D-аспартат (NMDA)-рецептор путем изменения ионных токов кальция, натрия, калия [42].

Считается, что наилучший эффект может быть достигнут при сочетании пирацетама с циннаризином. Циннаризин выступает как ноотропное лекарственное средство благодаря блокированию кальциевых каналов [37].

В настоящее время известны официально зарегистрированные препараты,

в состав которых входят пирацетам и циннаризин. Например, «Омарон» включает в себя 400 мг пирацетама и всего лишь 25 мг циннаризина.

К основным показаниям для назначения препарата «Омарон» можно отнести:

- заболевания ЦНС, сопровождающиеся снижением интеллектуально-мнестических функций;
- энцефалопатии различного генеза;
- цереброваскулярные заболевания [61].

К установленным эффектам препарата можно отнести:

- улучшение перфузии головного мозга;
- потенцирование церебрального метаболизма.

Дизайн исследования эффективности препарата «Омарон» представлен на рисунке 1.

Препарат показал свою эффективность у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией. Применение препарата приводит к уменьшению жалоб пациентов на плохую память; сокращению количества эпизодов головных болей и головокружения; увеличению степени работоспособности [46]. Спустя 2 недели регулярного приема наблюдается улучшения состояния на 40%, а через 28 дней – в среднем на 70% [52]. Положительный эффект препарата на пациентов с диссомническими расстройствами может быть связан с седативным эффектом циннаризина.

Применение лекарственного средства в терапии ишемического инсульта приводит к сокращению неврологической нехватки – состояния, сопровождающегося нарушением функций нервной системы и таким симптомам как слабость, онемение, боль, нарушение координации и др. – на 46%. Также наблюдается положительная динамика в изменениях когнитивных функций (MMSE), эмоционально-волевой сферы (шкала HADS) по сравнению с пациентами, не принимающими ноотропные препараты [56].



Рисунок 1. Дизайн исследования эффективности препарата Омарон

По краткой шкале оценки психического статуса (MMSE) и по шкале выявления лобной дисфункции (FAB) также получено достоверное улучшение в группе лечения Омароном. После двух месяцев наблюдения у пациентов отмечены достоверные улучшения показателей неврологического статуса и уменьшение степени инвалидизации (по шкалам Рэнкина, Бартель, NIH–NINDS) [72].

Согласно результатам исследований авторов можно сделать заключение об успешности сочетания двух лекарственных веществ в составе одного препарата «Омарон».

Положительное действие ноотропов на память до сих пор обсуждалось в контексте влияния на энергетический обмен и холинергическую или глутаминергическую нейротрансмиссию. Недавние исследования показали, что эффект улучшения памяти напрямую зависит от уровня стероидов. Являясь мощными модуляторами транскрипции генов, кортикостероиды усиливают синтез белка, тем самым ноотропы могут оказывать модулирующее действие на

синтез белка [75]. Это предположение подтверждается тем, что ноотропы улучшают память, даже если они вводятся через несколько часов после испытания на обучение, а с другой стороны, наблюдением, что их эффект, улучшающий память, становится заметным только через 16-24 часа после лечения и испытания на обучение [72].

Если эффект улучшения памяти в экспериментах на крысах и терапевтический эффект у пациентов достигаются за счет одного и того же механизма действия, тот факт, что высокие уровни кортикостероидов подавляют действие ноотропов, также может иметь клиническое значение: в свете наблюдения, что у большинства пациентов с болезнью Альцгеймера повышен уровень стероидных гормонов, это могло бы объяснить, почему в клинических испытаниях всегда участвовала лишь небольшая часть пациентов, которые реагировали на лечение ноотропами [56].

Основные терапевтические эффекты ноотропных препаратов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные терапевтические эффекты ноотропных препаратов

Терапевтический эффект	Описание
Улучшение высших функций мозга	Препараты усовершенствуют концентрацию внимания, снижают время и число ошибок при решении задач, повышают уровень обучаемости, оперативную и долговременную память и навык к воспроизведению информации.
Восстановление пониженных и нарушенных функций	У здорового населения после тяжёлых стрессовых случаев/истощающих нагрузкой/даже у лиц с невротическими

Таблица 2 – Продолжение

	состояниями, нарушенной психической и социальной адаптацией – восстановительный.
Реабилитационный эффект	Сокращение срока функциональной реабилитации после черепно-мозговых травм, инсультов, интоксикации, в том числе нейротропными препаратами, алкоголем, наркотическими анальгетиками, свинцом, другими ядами и солями тяжёлых металлов.

Спектр фармакологической активности ноотропных препаратов представлен на рисунке 2.

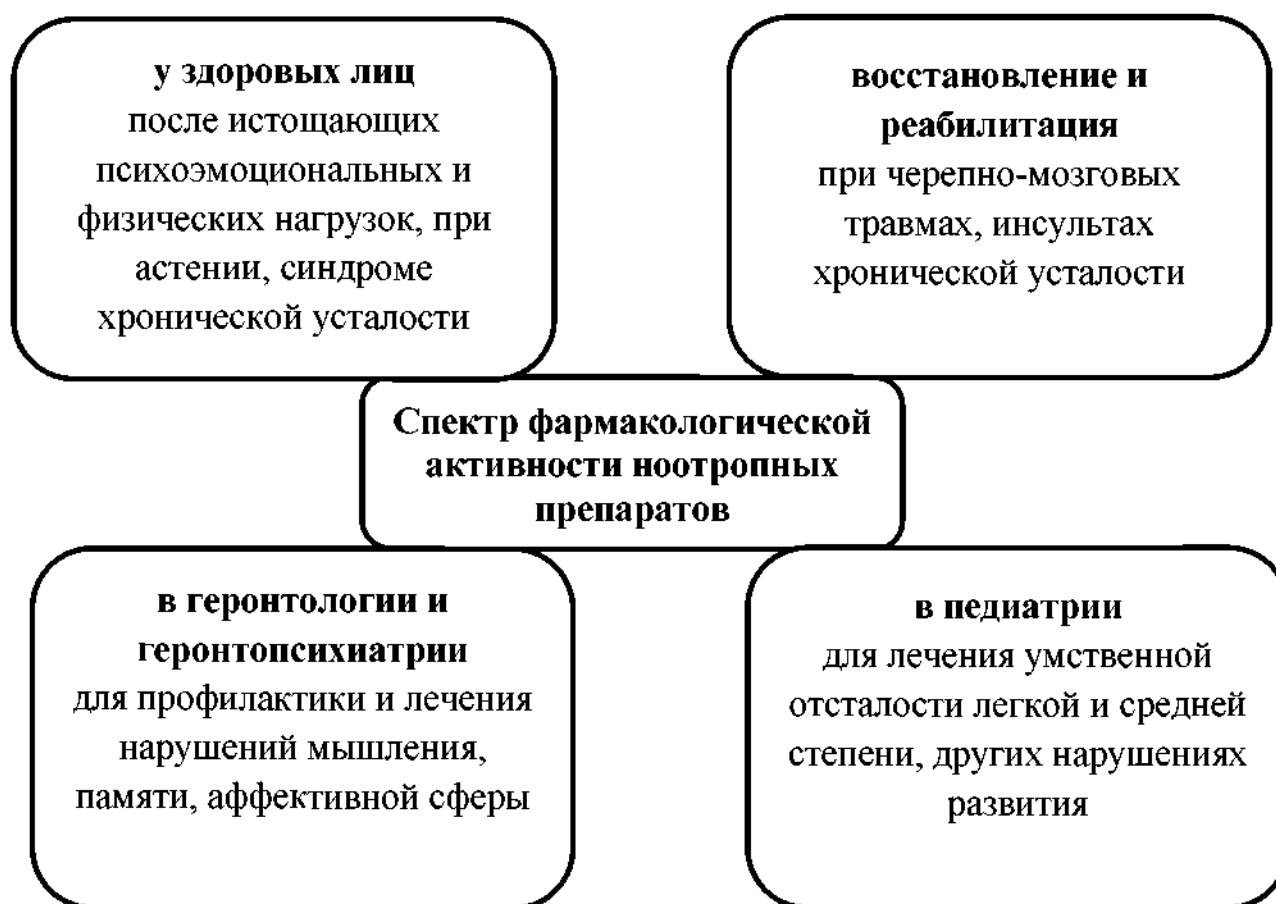


Рисунок 2. Спектр фармакологической активности ноотропных препаратов

1.2. Доклинические исследования ноотропных лекарственных препаратов

Прежде чем новому лекарственному препарату быть испытанным на людях, для начала он должен пройти тщательную проверку в рамках доклинических исследований [20]. Эти исследования призваны оценить безопасность и эффективность потенциального лекарства. Существуют документы, регулирующие проведение таких исследований, например, "Руководство по исполнению доклинических исследований лекарственных средств" под редакцией А.Н. Миронова и ГОСТ 56702-2015, регламентирующий доклинические токсикологические и фармакокинетические исследования безопасности.

Важным аспектом доклинических исследований является оценка стабильности препарата. При этом необходимо учитывать несколько ключевых факторов: выбор подходящих видов животных, их возраст и физиологическое состояние, а также способ введения препарата, включая дозу и режим лечения. Кроме того, необходимо убедиться в стабильности самого исследуемого вещества в условиях его применения.

Полученные данные о дозировке и токсичности соединения играют важную решающую роль в принятии решения о целесообразности и безопасности перехода к клиническим испытаниям на людях. Эти данные подкрепляются результатами фармакокинетических, фармакодинамических и токсикологических исследований, которые в совокупности позволяют оценить риски и потенциальную пользу от применения нового лекарственного средства [17].

Как лекарство влияет на организм и как организм влияет на лекарство – это ключевой вопрос, который изучает фармакодинамика. Данный раздел науки призван устанавливать связь между концентрацией препарата в организме и тем, какой эффект он оказывает. Что помогает нам понять, насколько сильным и эффективным является лекарство, а также насколько безопасно его

использовать.

Эффект лекарства напрямую зависит от количества активного вещества, которое достигло нужного места в организме. А это количество, в свою очередь, определяется тем, как лекарство всасывается, распределяется, перерабатывается и выводится из организма.

Многие лекарства применяются перорально и должны пройти через желудочно-кишечный тракт, чтобы попасть в кровь и достичь цели. Но, прежде чем попасть в общий кровоток, лекарству необходимо пройти через печень, где оно частично разрушается. Этот процесс называется "метаболизм первого прохождения" и снижает количество лекарства, которое в конечном итоге достигает своей цели. Внутривенное введение позволяет избежать этого эффекта, обеспечивая большую биодоступность. После попадания в кровь, лекарство распределяется по различным тканям организма.

Для оценки влияния новых веществ на мозг и их потенциальных ноотропных свойств, используются простые тесты на животных, такие как "Приподнятый крестообразный лабиринт" и "Открытое поле с объектами". Эти тесты позволяют оценить влияние веществ на обучение и память.

Прежде чем лекарство можно будет испытывать на людях, необходимо провести доклинические токсикологические исследования. Они помогают определить, какие дозы лекарства наиболее безопасны и с какой дозы можно начинать клинические испытания. Сначала проводятся исследования с однократной дозой, чтобы выявить органы, наиболее чувствительные к токсическому воздействию препарата. Затем проводятся исследования с повторными дозами, чтобы оценить долгосрочные эффекты [18].

Изучение воздействия лекарственных препаратов на организм начинается с оценки их токсичности. Первым шагом часто становится исследование однократной дозы, которое позволяет установить связь между количеством вещества и возникающими токсическими эффектами, как общими, так и локальными. Эти данные критически важны для определения дозировок,

которые будут использоваться в дальнейших, более длительных исследованиях токсичности. Информацию о зависимости "доза-реакция" можно получить не только в специализированных исследованиях токсичности, но и в рамках фармакологических исследований или исследований эффективности на животных моделях.

Для биофармацевтических препаратов, которые могут оказывать длительное воздействие, необходимо наблюдать за животными после прекращения введения препарата, чтобы убедиться в обратимости вызванных изменений. Продолжительность исследований повторных доз определяется предполагаемой длительностью клинического применения препарата и характером заболевания. Как правило, для большинства биотехнологических препаратов достаточно исследований продолжительностью от одного до трех месяцев. Однако, для препаратов, предназначенных для краткосрочного применения (менее недели) или для лечения острых, угрожающих жизни состояний, достаточно двухнедельных исследований повторных доз для поддержки клинических испытаний и получения разрешения на продажу. В случае препаратов, предназначенных для хронического применения, обычно проводят шестимесячные исследования.

Важно выявить любую нежелательную фармакологическую активность препарата, используя соответствующие животные модели. При необходимости, в исследования токсичности и/или клинические испытания включают специальный мониторинг этих активностей. Фармакологические исследования безопасности направлены на измерение функциональных показателей, которые могут указывать на потенциальную токсичность. Эти показатели могут изучаться как в отдельных экспериментах, так и в рамках исследований токсичности [27].

Целью фармакологических исследований безопасности является выявление различных функциональных эффектов на основные физиологические системы, такие как сердечно-сосудистая, дыхательная,

выделительная и центральная нервная системы. В исследованиях могут использоваться не только целые животные, но и изолированные органы или другие тест-системы. Все эти исследования позволяют объяснить специфическую токсичность препарата для определенных органов, что необходимо учитывать при его применении у людей и определении показаний к применению. В ходе исследований животные подвергаются регулярным клиническим осмотрам, а также периодическим анализам крови и мочи. По завершении исследования проводится тщательное патологоанатомическое обследование всех животных [17].

В токсикологических исследованиях, изучение клеточной структуры органов и тканей открывает уникальную возможность для выявления повреждений, определения их биологической роли и специфических характеристик. Для получения достоверных результатов микроскопического анализа требуется экспертное умение различать гистоморфологические особенности здоровых и поврежденных тканей.

В длительных экспериментах критически важно тщательно отслеживать тканевые реакции у подопытных животных, сравнивая их с контрольной группой. В краткосрочных исследованиях токсичности микроскопический анализ позволяет точно определить органы, наиболее подверженные морфологическим изменениям, и внести ясность в понимание механизма действия изучаемого препарата.

Результаты, полученные в ходе доклинических исследований хронической токсичности лекарственных средств, играют ключевую роль в дальнейшей разработке препаратов и планировании клинических испытаний. Патоморфологические исследования позволяют выявить органы, в которых произошли морфологические изменения под воздействием токсичного вещества, проследить динамику этих изменений и предоставить необходимые данные для оценки соотношения риска и пользы. Важно четко отличать изменения в клетках и тканях, вызванные препаратом, от возрастных изменений

или изменений, связанных с развитием патологических процессов.

Качество результатов экспериментальных исследований напрямую зависит от правильного отбора биологического материала, чистоты и точности проведения анализа, а также от тщательности пробоподготовки. При интерпретации результатов необходимо учитывать естественную изменчивость физиологических и патологических процессов у животных, а также возможное влияние различных факторов на основные параметры в условиях токсикологического эксперимента.

1.3. Пептидергическая система мозга

Нейропептиды представляют собой важный класс нейрорегуляторов. Функционируя как нейромодуляторы, они влияют на активность нейронов, регулируют уровни нейротрансмиттеров, усиливают или подавляют синаптическую передачу сигналов в центральной нервной системе (ЦНС), что важно для формирования новых связей между нейронами. Нейропептидам мозга также принадлежит роль регуляторов работы других систем: эндокринной и иммунной. Нейропептиды играют важную роль в регуляции внимания, памяти, способности к обучению, а также в формировании реакции на стресс.

Ферменты, вовлечённые в процессинг пептидов, также играют важную роль в регуляции работы пептидергической системы: принимают участие на этапе созревания нейропептидов и преобразования их функциональной активности путём ограниченного протеолиза и сортировки [70].

Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО) играет ключевую роль в нейрохимической регуляции реакции организма на стресс, а также в поддержании гомеостаза и метаболического баланса [46].

Подготовка к работе кортиколиберин содержащего нейрона паравентрикулярного ядра гипоталамуса даёт начало старта работы ГГНО. Он

действует через CRHR1 на кортикотропные клетки передней доли гипофиза, что приводит к стимуляции синтеза проопиомеланокортина (ПОМК) состоящего из 241 аминокислоты, его ограниченного протеолиза и выделению адренокортикотропного гормона (АКТГ из 39 аминокислот) в кровоток. Секреция АКТГ приводит к усилению синтеза и выделению кортизола надпочечниками [68].

В то время как молекулярно-физиологические механизмы действия АКТГ и кортизола были детально изучены в 20 веке более глубокое понимание роли кортиколиберина, как в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО), так и за её пределами было сформировано лишь в последние десятилетия.

Установлено, что кортиколибериновые нейроны проецируются не только в срединное возвышение, но и в норадренергическую область голубого пятна, центральное ядро амигдалы и ядро ложа терминальной полости. Помимо гипоталамуса, экспрессия кортиколиберина обнаружена в нейронах обонятельных луковиц, центральном ядре амигдалы, ядре ложа терминальной полости, прилежащем ядре, коре головного мозга, гиппокампе, околосерозном сером веществе, ядрах шва, латеральном ядре покрышки, парабрахиальном ядре, ретикулярной формации среднего мозга, голубом пятне, среднем вестибулярном ядре и дорсальном блуждающем комплексе [58].

Кортиколиберин берёт на себя осуществление эндокринной функции в гипоталамусе, однако в миндалевидном теле и голубом пятне он участвует в формировании поведенческих реакций на стресс, памяти, аппетита [29, 37].

Исследования на крысах показали, что стресс активирует CRHR2-содержащие нейроны, расположенные в медиальной обонятельной зоне. Окончания нейронов миндалевидного тела распространяются в голубое пятно, в ядро ложа терминальной полости и в зону дорсального шва. Эти нейроны секретируют кортиколиберин и увеличивают степень тонической регуляции [36].

У экспериментальных животных с высоким уровнем тревоги наблюдается повышенная секреция нейрокина А в поясной коре, стриатуме и околосеротонинергическом сером веществе [16].

Интересно, что у мышей с нокаутом гена гемокина-1 наблюдается повышенный уровень базовой тревожности [5].

При инъекции нейропептида Y наблюдается пониженная степень тревожности у экспериментальных животных. Увеличение восприимчивости людей к стрессу зависит от наличия SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) полиморфизмов в гене данного нейропептида.

Роль нейропептидов в развитии реакции на стресс и их эффекты представлены в таблице 3 [28, 35].

Таблица 3 – Роль нейропептидов в развитии реакции на стресс

Название нейропептида	Биологический эффект
Нейропептид S	при связывании с рецепторами в амигдале стимулирует секреция глутамата, что приводит к понижению уровня тревожного поведения
Орексины	играют роль в процессах возбуждения, бдительности и мобилизации вегетативной нервной системы; проявляют анксиогенный эффект
Галанин	секреция и снижение тревожности – адаптивный механизм защиты от чрезмерного стресса
Меланин-концентрирующий гормон	активирует стрессовый ответ и вызывает депрессивное и тревожное поведение у животных
Киспептин и соматостатин	снижение секреции приводит к повышению тревожности

Кокаинамфетамин-регулируемый транскрипт	анксиогенный эффект
Холецистокинин	повышает тревожность и усиливает чувство страха, действуя через ССК2-рецепторы; модулирует работу ГАМКергической,

Таблица 3 – Продолжение

	глутаматергической и дофаминергической систем в стриатуме, коре головного мозга и гиппокампе
Лептин	активация лептиновых рецепторов на N PY-нейронах в дугообразном ядре гипоталамусе приводит к снижению тревожности

Таким образом, изучение сведений о роли различных нейромедиаторных систем доказывает, что тревожность является комплексным явлением, регуляция развития которого многоступенчата и нарушается при аффективных патологиях. Именно нейропептидам принадлежит ключевая роль в процессе регуляции тревожного поведения, так как они служат модуляторами работы классических нейромедиаторных систем в отделах мозга, участвующих в обработке стрессовых стимулов и запуске процессов адаптации к ним.

1.4. Карбоксипептидаза E как ключевой фермент обмена регуляторных пептидов

Карбоксипептидаза E – это фермент класса эндопептидаз, который принимает участие в биосинтезе широкого спектра пептидных гормонов и нейромедиаторов (рис. 3).

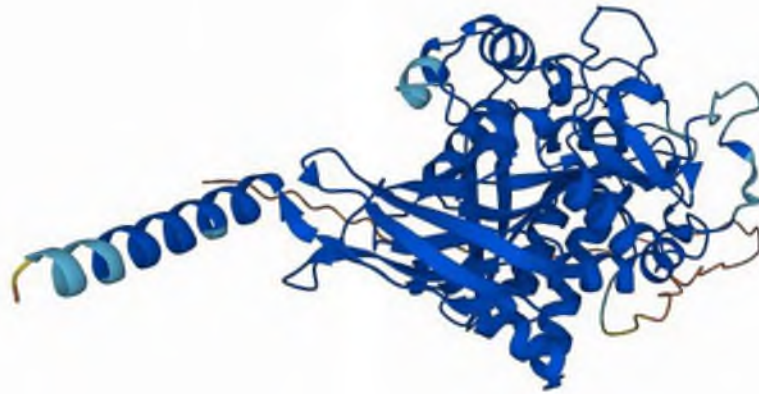


Рисунок 3. Структура карбоксипептидазы E, сгенерированная AlphaFold

Доказательством этого является следующее:

- 1) КПЕ присутствует в тканях, которые синтезируют биоактивные пептиды;
- 2) активность КПЕ коррелирует с количеством пептид-содержащих секреторных гранул;
- 3) КПЕ может удалять С-концевые основные аминокислоты из различных синтетических пептидов без дальнейшего гидролиза пептида;
- 4) КПЕ активна при pH 5,6, внутреннем pH секреторных гранул [48].

Существует две формы КПЕ: растворимая 53,2 кДа и мембраносвязанная 55 кДа, которые присутствуют в большинстве тканей, обладающих активностью КПЕ. Эти две формы немного отличаются по молекулярной массе, но обладают идентичными ферментативными свойствами. Обе формы КПЕ происходят от одного и того же предшественника, который кодируется одним геном. Этот ген относится к семейству генов карбоксипептидаз, в которое входят КПА и КПВ [24]. Другое название этого фермента – энкефалинконвертаза. Она была впервые идентифицирована как карбоксипептидаза В-подобный фермент, который принимает активное участие в биосинтезе энкефалина в хромаффинных гранулах надпочечников крупного рогатого скота [26]. pH-оптимум 5,5-5,6, pI 5, ингибируется хелаторами, GEMSA и другими сульфгидрильными агентами, а также рядом биологически

активных пептидов. Для работы фермента необходимы ионы Zn^{2+} или Co^{2+} [76].

Фермент присутствует во многих областях головного мозга и в очищенных секреторных гранулах гипофиза крысы и инсулиномы крысы. Внутри секреторных гранул карбоксипептидаза Е находится как в растворимой, так и в мембраносвязанной форме, которые незначительно различаются по относительной молекулярной массе (Mr). Фермент КПЕ обнаружен в гипофизе, гипоталамусе, стриатуме, гиппокампе, миндалевидном теле, среднем мозге и коре больших полушарий, надпочечниках [34]. Самая низкая активность КПЕ установлены для стволовой части головного мозга, спинного мозга, легких, сердца, желудочно-кишечного тракта, печени, а также почки [20].

Карбоксипептидаза Е участвует в финальной стадии посттрансляционной обработки предшественников нейропептидов, удаляя последние аминокислотные остатки с карбоксильного конца, что приводит к образованию активных форм нейропептидов, таких как субстанция Р, вазоактивный кишечный пептид (VIP), нейропептид Y и др. Ферментативная активность КПЕ связана с уровнем активных нейропептидов в нервной системе и других тканях, что влияет на процессы передачи сигналов, регуляцию боли, аппетита, настроения и других функций. Изменения активности коррелирует с развитием различных неврологических и эндокринных нарушений, опухолевым ростом.

Фермент играет главную роль в стимулировании роста, выживаемости и метастазирования различных типов рака [37]. КПЕΔN – новая форма карбоксипептидазы Е, которая была расшифрована в гепатоцеллюлярных карциномах только к 2011 году [35]. Данная форма была получена с помощью клонирования N-концевой формы КПЕ с усеченным сплайсингом (КПЕΔN), которая была обнаружена при высокой экспрессии в злокачественных опухолях и клеточных линиях, полученных из рака предстательной железы, молочной железы, печени и легких, а также глиом [39].

Клинические исследования показывают, что мРНК и фермент КПЕ и

КПЕΔN являются потенциальными диагностическими и прогностическими биомаркерами для нескольких типов рака, анализируемыми с использованием солидных опухолей и секретируемых сывороточных экзосом.

Было доказано, что КПЕ является терапевтической мишенью для нескольких типов рака. мРНК КПЕ/КПЕ-ΔN, которая транспортируется через экзосомы и поглощается реципиентными раковыми клетками с высоким уровнем метастазирования, подавляет рост и пролиферацию этих клеток [28]. Таким образом, будущие исследования по доставке мРНК КПЕ/ КПЕΔN, возможны, через экзосомы в опухоль могут стать новым подходом к лечению для подавления роста опухоли и метастазирования [32].

Чуть позже исследовательским путём было доказано, что люди, страдающие от ГЦК, демонстрируют высокий уровень рецидивов в течение двух лет после того, как была проведена операция. Также среднее время выживаемости пациентов падает, по сравнению с людьми, у которых наблюдается низкий уровень экспрессии КПЕΔN[23].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методы выделения и очистки пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа

В качестве сырья для получения пептидов выступал трутневой расплод, который был собран в 2022-2024 годах на пасеках Пензенской области. Порода пчел – «Карника». Трутневой расплод хранился в замороженном виде при температуре -18-20°C. На рисунке 4 показаны основные этапы экспериментального исследования биологических эффектов пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа.

I этап. Выделение пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа из трутневого расплода	
	Приготовление гомогената (50г трутневого расплода на 100 мл H ₂ O)
	«Грубая» фильтрация на воронке Бухнера через фильтр «красная лента»
	Разделение на ультрафильтрационной установке MasterFlex с мембраной VivaFlow
II этап. Очистка пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа от углеводных компонентов методом ионообменной хроматографии	
III этап. Контроль количественного содержания пептидов спектрофотометрическим методом	
VI этап. Оценка наличия ноотропной активности пептидов в тестах in vivo	

Рисунок 4. Основные этапы экспериментального исследования

Первый этап является одним из наиболее важных при проведении эксперимента. Качественное выделение пептидных фракций с необходимым значением молекулярной массы возможно только при корректной подготовке ультрафильтрационной установки.

Основные этапы подготовки мембраны для разделения пептидов включают:

- промывка мембраны от загрязняющих веществ дистиллированной водой;
- промывка 0,5 н раствором NaOH для сапонификации не отмывшихся загрязнителей (0,5-1 объёмов исходного резервуара);
- промывка мембраны от раствора щелочи и оставшихся загрязняющих веществ тем же объёмом дистиллированной воды.

Принцип ультрафильтрации на установке VivaFlow – фильтрация в тангенциальном потоке. Полученный концентрированный фильтрат хранился в плотно закрытой стеклянной ёмкости в морозильнике.

На втором этапе эксперимента использовался метод ионообменной хроматографии с DEAE-целлюлозой в качестве матрицы. Для очистки пептидов от углеводов важным является правильная подготовка ионообменника. К 3 г DEAE- целлюлозы приливают 500 мл дистиллированной воды и оставляют в течение суток для набухания. После 24 часов набухания необходимо несколько раз взмутить ионообменник и дождаться, когда гранулы целлюлозы оседут. 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, объемом 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 объема 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 объемом 2 мл, буфер менялся после пятнадцатой фракции. После сбора фракций колонка уравнивалась 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 на длине волны равной 280 нм, содержание углеводов — реакцией Селиванова на длине волны 490 нм.

На третьем этапе эксперимента проводилось спектрофотометрическое определение концентрации пептидов с помощью измерения поглощения при длине волны, равной 280 нм. Метод основан 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 на длине волны $\lambda = 280$ нм против контроля (чистый растворитель). По полученным результатам строился профиль элюции пептидов. Также

показатели поглощения использовались для определения концентрации пептидов в растворе с помощью метода калибровочного графика 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. К аликвоте 0,5 мл приливался 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. Для количественного определения фруктозы использовался метод калибровочного графика.

2.2. Методы изучения ноотропной активности пептидов в тестах *in vivo*

Эксперимент проводился на 24 половозрелых самцах крыс-альбиносов, которые были отобраны по возрасту (5-6 месяцев) и весу (290-310 грамм). Содержание животных осуществлялось в виварии с контролируемыми параметрами: естественный цикл освещения, влажность 45-50%, температура 22-24°C, и стандартный рацион питания [8].

Перед началом эксперимента крысы были разделены на четыре группы, по шесть особей в каждой. Контрольные и опытные группы содержались отдельно друг от друга. Условия содержания и проведения экспериментов соответствовали действующим стандартам по уходу за лабораторными животными (ГОСТ 34088–2017«Руководство по содержанию и уходу за

лабораторными животными») [6].

В ходе эксперимента животным вводили следующие растворы:

Контрольная группа 1: Внутривентрикулярно вводился физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме 1 мл.

Контрольная группа 2: Интраназально вводился физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме 10 мкл.

Опытная группа 1: Внутривентрикулярно вводился раствор пептидов трутневого расплода (молекулярная масса 5-10 кДа) в дозировке 500 мкг/кг массы тела, в объеме 1 мл.

Опытная группа 2: Интраназально вводился раствор пептидов трутневого расплода (молекулярная масса 5-10 кДа) в дозировке 100 мкг/кг массы тела, в объеме 1 мл.

Введение растворов осуществлялось ежедневно, однократно, в период с 9:00 до 12:00 в течение 21 дня. По завершении периода введения, оценивалось поведение животных с помощью использования тестов "Открытое поле с объектами" и "Приподнятый крестообразный лабиринт".

2.2.1. Тест «Открытое поле с объектами»

Наиболее популярной из экспериментальных методик для оценки тревожного поведения животных является тест «Открытое поле» (Open Field Test).

В основе теста «Открытое поле» лежит наблюдение за отдельными параметрами поведения животного после того, как оно оказывается в незнакомой для него среде. 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 загроблению 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:

Горизонтальная активность в центре арены и у периферии,

Стойки на задних лапах,

Интерес к отверстиям на поверхности арены,

Фризинг – замирание без движения,

Грумминг – гигиенические процедуры [23].

2.2.2 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Методика основана на том, что грызуны преимущественно изучают темные норы поля, при нахождении в состоянии естественного страха на

открытых площадках и падения с высоты. Описание и оценка метода наиболее подробно представлены в работах [10, 11, 12, 15, 16].

Популярным 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 $10 \times 10 \times 50(60)$ см, центральная площадка $10 \times 10 \times 10$ см, ПКЛ приподнят на 80–100 см; для мышей рукава составляют $5 \times 5 \times 20$ (25) см, центральная площадка — $5 \times 5 \times 5$ см, ПКЛ приподнят на 25(30) см.

Первый этап тестирования – это погружение экспериментальных животных от трёх до пяти минут времени в темные клетки. После чего, грызуны отправляются 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.

Ярко выраженное эмоциональное состояние крыс оценивается также по числу мочеиспусканий и болюсов. В каких-то исследованиях может использоваться приподнятый зего- лабиринт. Такой вид лабиринта представляет собой кольцевую приподнятую платформу с чередуемыми двумя открытыми и двумя закрытыми четвертями круга.

2.2.3 Определение активности карбоксипептидазы E

После проведения поведенческих тестов крысы были выведены из эксперимента путём декапитации на гильотине с последующим сбором крови в вакуумные пробирки LumiMed с активатором свёртывания и забором надпочечников, гипофиза, гипоталамуса, стриатума, гиппокампа, миндалевидного тела, четверохолмия и продолговатого мозга. Из образцов крови была выделена сыворотка путём центрифугирования при 2000 g в течение 15 минут.

Активность КПЕ определяли в гомогенатах надпочечников и отделов мозга с помощью модифицированного метода Fricker и Snyder (табл. 4) [59].

Таблица 4 – Метод определения активности карбоксипептидазы E

Опытная проба	Контрольная проба
50 мкл гомогената	
150 мкл 50 mM натрий-ацетатного буфера с 50 mM NaCl (pH = 5,6)	140 мкл 50 mM натрий-ацетатного буфера с 50 mM NaCl (pH = 5,6)
–	10 мкл 25 мкM GEMSA (ингибитор)
Преинкубация при 37 °C в течение 5 минут	
50 мкл дансил-фен-ала-арг (субстрат)	
Инкубация при 37 °C в течение 60 минут	
50 мкл 1 M HCl	

После окончания реакции проводили хлороформную экстракцию

продукта дансил-фен-ала, добавляя 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивая пробы в течение 1 минуты, с последующим центрифугированием при скорости 1000 об/мин в течение 10 минут. Флуоресценцию хлороформной фазы измеряли при $\lambda_{ex}=360$ нм и $\lambda_{em}=530$ нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы на анализаторе Флюорат-02-АБФЛ-Т. Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури. Активность фермента определяли по разнице флуоресценции между опытными и контрольными пробами и выражали в нмоль дансил-фен-ала, образовавшегося за 1 минуту в пересчёте на 1 мг белка [66].

2.3. 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

Этапы выделения пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа из трутневого расплода представлены на рисунке 5.

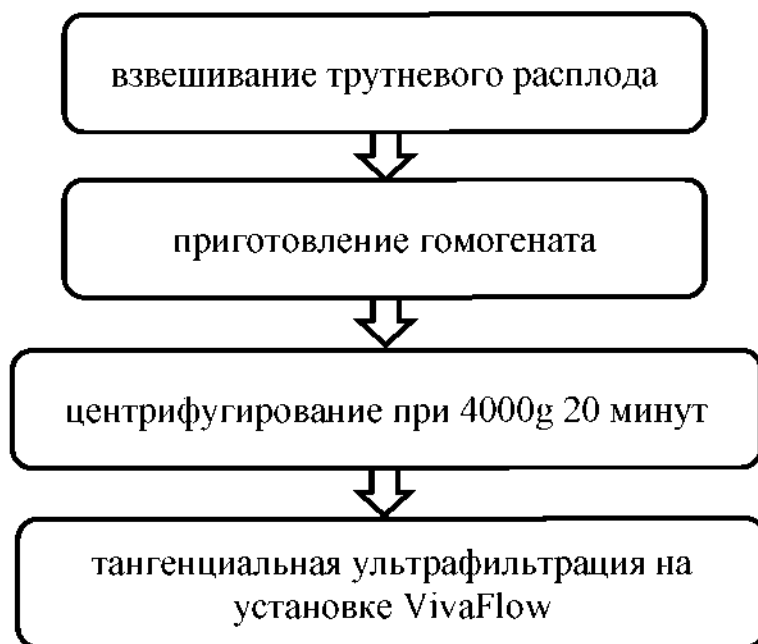


Рисунок 5. Этапы выделения пептидных фракций с молекулярной массой 5-10 кДа из трутневого расплода

Полученный после тангенциальной ультрафильтрации на установке VivaFlow раствор представляет собой сложную смесь низкомолекулярных соединений: в своём составе содержит пептиды с молекулярной массой 5-10 кДа, углеводы, фенольные соединения, пигменты и другие низкомолекулярные компоненты. Необходимо отметить, что биологическая активность полученного раствора, может быть обусловлена не только свойствами его отдельных компонентов, но ещё и синергическим взаимодействием, которое способно создать уникальный эффект.

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

3.1. Результаты очистки пептидов от углеводов методом ионообменной хроматографии

Для оптимизации этапа очистки пептидов трутневого расплода от углеводов, было необходимо подобрать объем наносимого раствора, который в свою очередь гарантирует максимальный выход целевых пептидных фракций. В связи с этим проводили хроматографию со следующими объемами проб: 0,75; 0,5 и 0,35 мл. Профили элюции представлены на рисунках 6-8.

Параметры хроматографической системы все время были постоянными: высота ионообменного столба составляла 6,5 см, диаметр колонки — 1,75 см.

Элюция первых восьми пептидных фракций проводилась начальным буфером (0,2 М трис- HCl, pH = 9).

А десорбция закрепившихся пептидов на колонке, осуществлялась вторым буфером (0,2 М Na–цитратный, pH = 6) во фракциях с 9 по 16.

Одновременно с определением содержания пептидов проводили анализ количественного содержания углеводных компонентов.

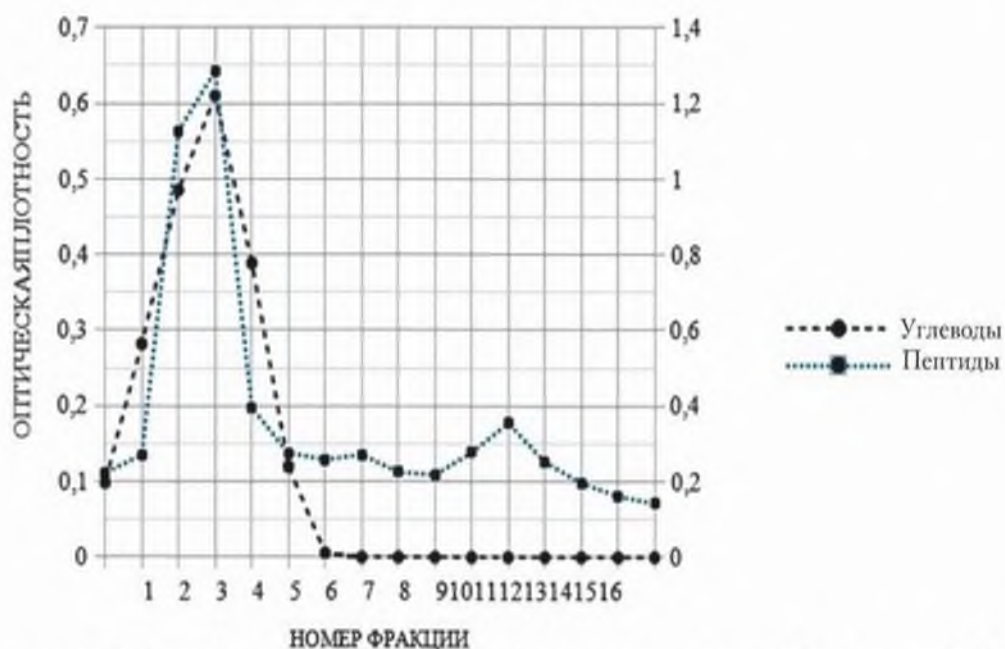


Рисунок 6. Профиль элюции пептидов и углеводов. Объем проб 0,75 мл

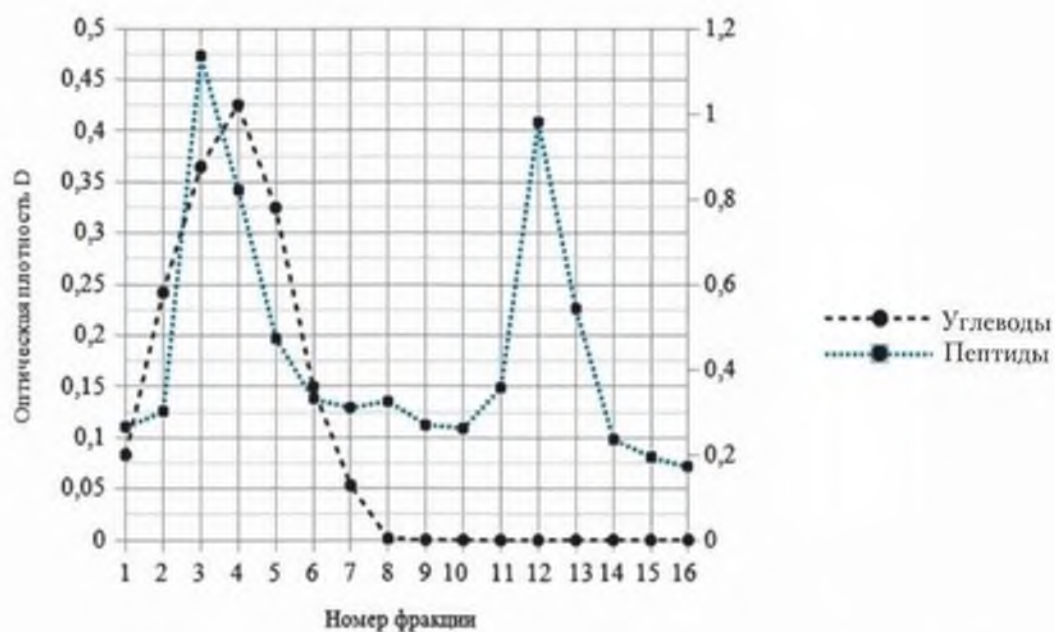


Рисунок 7. Профиль элюции пептидов и углеводов. Объем проб 0,5 мл

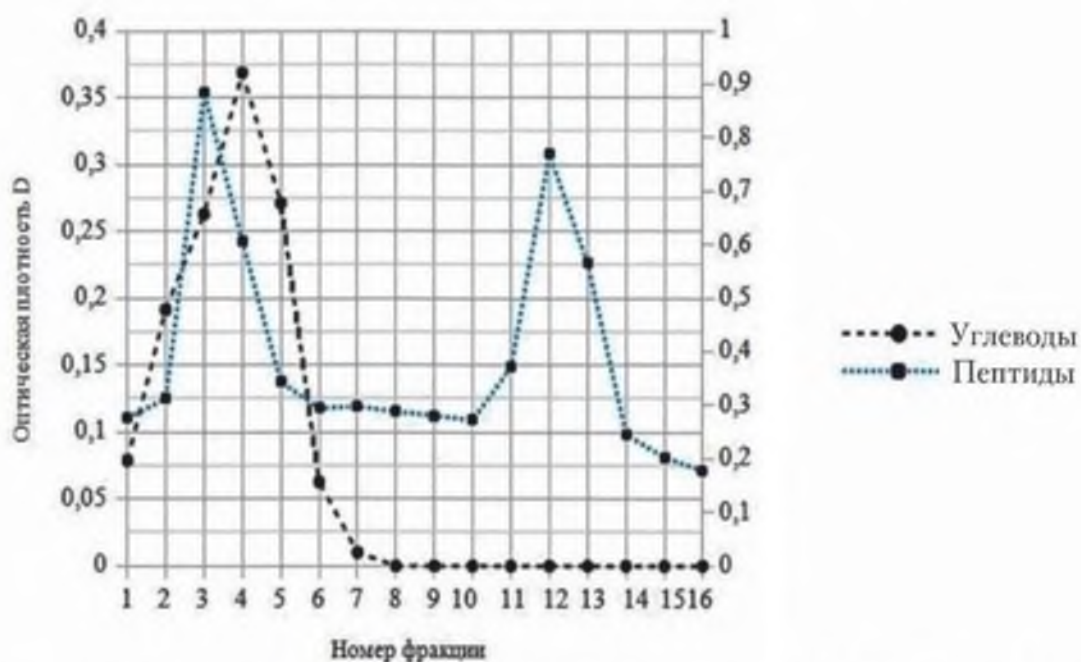


Рисунок 8. Профиль элюции пептидов и углеводов. Объем проб 0,3 мл.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что нанесение пробы объемом 0,75 мл приводит к неудовлетворительному результату очистки пептидов. Значительное количество пептидов остаётся несвязанными, эффективность процесса низкая.

Экспериментально было доказано, что объем в 0,5 мл обеспечивает

оптимальное соотношение между связанными и несвязанными пептидами.

Дальнейшее сокращение объема до 0,35 мл приводит к резкому уменьшению выхода очищенных пептидов. В связи с этим, оптимальным объёмом пробы для нанесения на колонку является 0,5 мл.

На основе полученных данных оптических плотностей, используя метод калибровочного графика, было вычислено содержание пептидов и углеводов в каждой из фракций. Данные значения необходимы для расчёта пептидов трутневого расплода при использовании метода ионообменной хроматографии.

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.

Содержание пептидов и углеводов в различных фракциях можно увидеть на рисунках 9-11. Анализ данных профилей позволяет дать оценку эффективности разделения и удаления углеводов.

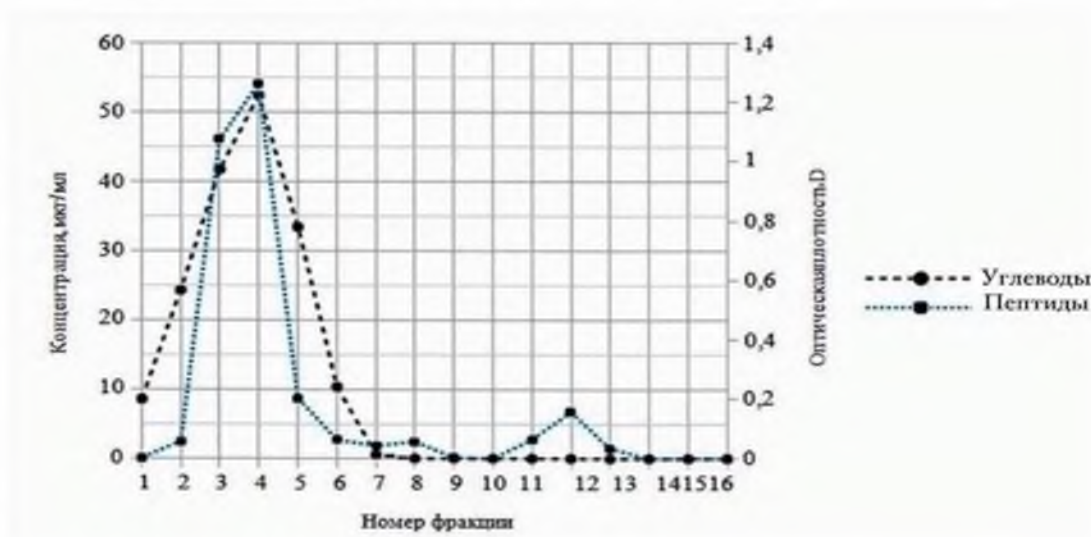


Рисунок 9. Содержание пептидов и углеводов в различных фракциях.

Объём пробы 0,75 мл

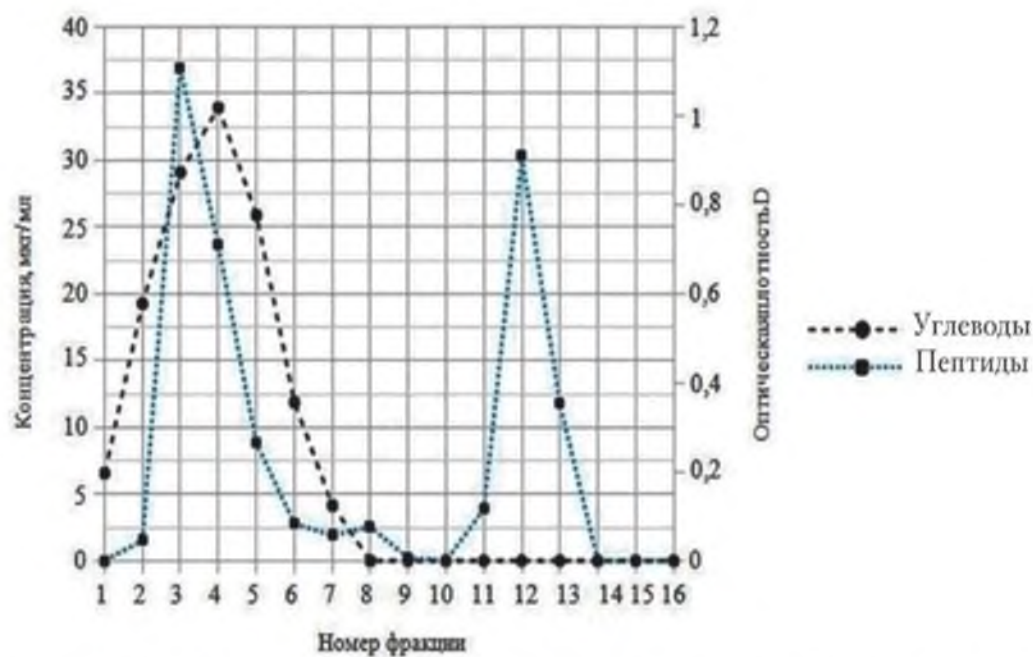


Рисунок 10. Содержание пептидов и углеводов в различных фракциях.
Объем пробы 0,5 мл

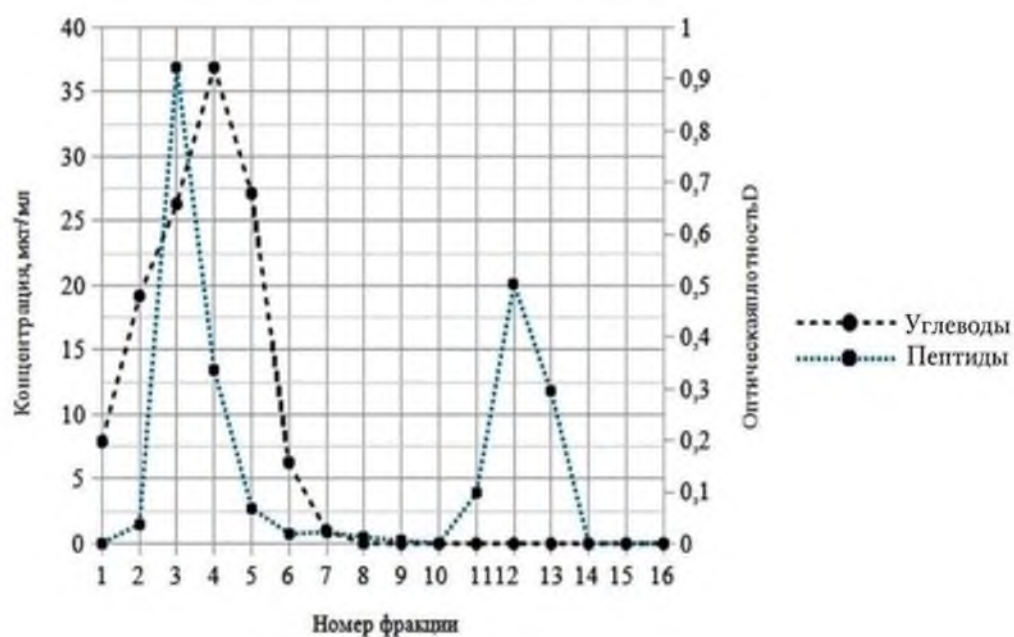


Рисунок 11. Содержание пептидов и углеводов в различных фракциях.
Объем пробы 0,35 мл

3.2. Результаты теста «Открытое поле с объектами»

Анализ поведения животного предполагает изучение движений животного в процессе решения специфических задач.

В тесте «Открытое поле с объектами» мы отслеживали различные поведенческие реакции крыс, а именно:

1) пространственная ориентация (выход в центр арены и перемещение по периметру поля);

2) исследовательская активность (горизонтальная и вертикальная двигательная активность, исследование отверстий);

3) стресс-реакции (фризинг, груминг и уровень дефекаций).

Экспериментальные животные длительное время реагировали на новую среду обитания с безразличием.

Количественные показатели поведения животных в тесте «Открытое поле с объектами» представлены в таблицах 5-6.

Таблица 5 – Количественные показатели двигательной активности крыс в тесте «Открытое поле с объектами» (- $p < 0,05$ по сравнению с контролем)*

Группа животных	Исследуемый параметр, с		
	ГДА	ВДА	Выход в центр арены
Контроль 1	115±5	119±8	408±11
Опыт 1	120±12	148±7*	492±9*
Контроль 2	108±10	118±7	434±17
Опыт 2	107±9	145±6*	513±21*

Животные, проходящие испытание, демонстрировали передвижения вдоль стен арены, сокращая дистанцию, уклонялись от открытых пространств. В ходе тестирования животные адаптировались, шаг за шагом осваивали центр арены, что является главным индикатором эмоционального состояния животных и показателем снижения тревоги.

Горизонтальная двигательная активность проявлялась в различных направлениях перемещений: целенаправленном движении в центр арены и круговых движениях. Животные всех групп демонстрировали высокую ГДА, то есть пересекали большое количество секторов в арене, что свидетельствует о низком уровне тревожности у испытуемых животных. В состоянии ожидания опасности, наблюдается противоположная картина в поведении животных: активация симпатической нервной системы приводит к увеличению двигательного напряжения при этом животное старается найти укрытие вне центра арены. Результаты исследования показали отсутствие статистически значимых отличий по показателю ГДА между группами животных с внутрибрюшинным и интраназальным введением, между контрольной и опытной группами.

Вертикальная двигательная активность (ВДА) животных в открытом поле оценивалась по двум типам стоек:

1. Стойки с использованием стенок арены;
2. Стойки с подъёмом на задние лапы без опоры.

Анализ общей вертикальной двигательной активности проводился с учетом обоих видов стоек, что позволило получить наиболее полное представление о вертикальной активности животных в тесте. Введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к увеличению общей вертикальной двигательной активности по сравнению с контролем: на 23% при интраназальном введении, на 24,5% при внутрибрюшинном введении. При этом в обеих опытных группах изменения параметра происходят за счет увеличения времени стоек с использованием стенок арены, что говорит об активации исследовательского поведения, подавленного в условиях тревоги и стресса. Достоверных изменений во времени стоек с подъёмом на задние лапы без опоры не обнаружено, что подтверждает выводы ряда авторов о том, что данный вид двигательной активности является наиболее сложным и требует максимальной расслабленности животного.

Введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в

течение 21 дня приводит к увеличению времени выхода в центр арены по сравнению с контролем: на 18% при интраназальном введении, на 21% при внутрибрюшинном введении. Выход в центр арены является одним из проявлений способности животных исследовать открытое поле. Чем больше животные находятся в центре площадки, тем ниже их уровень тревожности и выше способность к изучению новой территории.

Таблица 6 Количественные показатели психоэмоционального состояния крыс в тесте «Открытое поле с объектами» (- $p < 0,05$ по сравнению с контролем)*

Группа животных	Исследуемый параметр		
	Дефекация, кол-во	Груминг, с	Фризинг, с
Контроль 1	10±2	60±7	10±3
Опыт 1	5±1*	102±8*	4±1*
Контроль 2	12±2	85±4	11±3
Опыт 2	6±1*	140±11*	7±1*

Введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к уменьшению количества актов дефекаций в два раза в обеих опытных группах по сравнению с контролем.

Статистически значимо увеличивается общее время груминга: при интраназальном введении пептидных фракций на 65% и при внутрибрюшинном введении пептидных фракций на 70% по сравнению с контролем. Выделяют два вида груминга: короткий, когда животное прекращает движение и начинает чистить мордочку, и длительный, когда животное чистит всё тело. Короткий груминг является показателем активации симпатической нервной системы в ответ на стресс, длительный является показателем комфортного состояния животного.

Фризинг иллюстрирует собой реакцию поведения животных, которая проявляется в целом обездвиживании животного, зачастую можно стать

свидетелем замирания в физиологически неудобной для них позе. Данное состояние рассматривается как проявление страха и высокой тревожности, поскольку замирание является естественной реакцией крыс на первые признаки опасности. Сокращение частоты эпизодов замирания подтверждает нормализацию эмоционального состояния и возрастания исследовательской активности у животных. Введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к уменьшению времени замирания животных: на 60% при внутрибрюшинном введении пептидных фракций и на 36% при интраназальном введении относительно контрольных групп.

Крысы, получавшие пептиды трутневого расплода, показывают увеличение времени демонстрации исследовательского поведения – норкового рефлекса.

Таким образом, было установлено, что интраназальное и внутрибрюшинное введение пептидов трутневого расплода в течение 21 дня приводит к достоверному изменению поведения крыс в тесте «Открытое поле с объектами». Известно, что в ответ на стрессовое воздействие происходит активация симпатической нервной системы, приводящее к подавлению желания исследовать неизвестное у животных. При введении пептидов отмечено увеличение вертикальной двигательной активности, времени выхода животных в центр арены, норкового рефлекса, времени груминга за счет увеличения продолжительности длительного груминга, снижение времени фризинга и количества актов дефекации по сравнению с контролем. Данные изменения в поведении свидетельствуют о снижении общего уровня тревоги и стресса у животных и активации исследовательского поведения.

В связи с тем, что под ноотропным эффектом понимают оптимизацию работы мозга, повышение его когнитивных возможностей и устойчивости к стрессам и повреждениям, необходимо проведение исследований, направленных на изучение биологической активности выделенных пептидов на молекулярном уровне.

3.3. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В ходе эксперимента контрольные группы животных отдавали предпочтение находиться большую часть времени в закрытых и темных рукавах.

Для проведения поведенческой оценки животных было необходимо включить в её анализ нижеприведённые параметры:

- 1) количество заходов животных в рукава лабиринта;
- 2) количество заходов животных в центр и свешивания;
- 3) количество переходов в открытый и закрытый рукава.

Количественные показатели поведения животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» представлены в таблицах 7-8.

Таблица 7 – Время нахождения крыс в различных частях установки «Приподнятый крестообразный лабиринт» (- $p < 0,05$ по сравнению с контролем)*

Группа животных	Исследуемый параметр, с		
	Закрытый рукав	Открытый рукав	Центр
Контроль 1	322±15	71±5	30±2
Опыт 1	274±11*	98±7*	47±3*
Контроль 2	308±10	67±3	33±2
Опыт 2	266±9*	95±6*	45±2*

Интраназальное и внутрибрюшинное введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к изменению времени нахождения крыс в различных частях установки «Приподнятый крестообразный лабиринт». Отмечено достоверное уменьшение времени нахождения животных в закрытом рукаве в опытных группах по сравнению с контролем: на 14% при интраназальном введении, на 15% при внутрибрюшинном введении. При этом увеличилось время нахождения животных в открытом рукаве и центре на 38% и 56% при внутрибрюшинном

введении, на 42% и 36% при интраназальном введении соответственно.

Таблица 8 Количественные показатели двигательной активности крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (- $p < 0,05$ по сравнению с контролем)*

Группа животных	Исследуемый параметр		
	Свешивания, с	Переход в открытый рукав	Переход в закрытый рукав
Контроль 1	6±2	6±1	7±2
Опыт 1	11±1	7±2	8±3
Контроль 2	8±2	6±1	8±2
Опыт 2	11±2	8±2	9±2

Достоверные изменения в двигательной активности животных по результатам эксперимента обнаружены не были, что говорит об отсутствии нейростимулирующего влияния пептидов.

Данный тест является классическим для оценки тревожности. Время нахождения животных в закрытых рукавах является показателем стрессового состояния, его уменьшение в опытных группах свидетельствует о большей устойчивости животных к стрессовому воздействию при введении пептидов. Вместе с тем, отмечено, что животные становятся более устойчивыми к новой обстановке: у них чаще наблюдаются периоды длительного и короткого груминга, увеличивается количество стоек в рукавах. Количество стоек в рукавах является показателем способности животных запоминать информацию и концентрировать внимание, а увеличение времени груминга и снижение времени замирания – показатели снижения базового уровня тревожности.

Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» показали, что внутрибрюшинное и интраназальное введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к снижению уровня стресса, увеличению когнитивных функций и стимуляции умственной

деятельности животных, повышению умственной работоспособности, концентрации внимания, что является прямым доказательством наличия ноотропного эффекта пептидов.

Полученные результаты очень важны и необходимы для дальнейшей разработки препаратов для улучшения когнитивных функций, включающих в свой состав пептиды трутневого расплода. Несмотря на наличие положительных эффектов при использовании обоих путей введения пептидов (внутрибрюшинного и интраназального), в случае практического применения пептидов интраназальный путь будет более предпочтительным как менее инвазивный и требующий меньшего количества пептидов для достижения эффекта.

Интраназальный путь введения веществ, при котором они попадают напрямую из носа в мозг является перспективным вариантом для лечения патологий нервной системы. К преимуществам такого способа доставки веществ можно отнести быстро наступающий фармакологический эффект, обход ГЭБ, снижение риска возникновения побочных эффектов. Недостатками являются быстрое удаление со слизистой, плохое проникновение через слизистую, наличие протеолитических ферментов, способных к разрушению действующих веществ.

3.4. Влияние пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа на активность карбоксипептидазы E

Известно, что содержание нейропептидов в клетках напрямую зависит от интенсивности процессов их образования и деградации. Регуляторные пептиды синтезируются в виде высокомолекулярных соединений, их активация происходит путем ограниченного протеолиза при участии ферментов обмена регуляторных пептидов, в том числе карбоксипептидазы E, отщепляющей остатки лизина и аргинина с С-конца. Помимо этого, фермент принимает участие в начальных стадиях инактивации нейропептидов с основными

аминокислотами на С-конце. По сведению ряда авторов изменение уровня регуляторных пептидов может быть связано с уменьшением или увеличением содержания нейромедиаторов, что подтверждает наличие сложных взаимодействий между различными системами мозга. Таким образом, изменение активности компонентов пептидергической системы может влиять на работу серотонинергической, дофаминергической и норадренергической систем мозга и наоборот. Предполагается, что такое изменение может являться одним из механизмов действия пептидов, через который опосредуется их ноотропный и анксиолитический эффекты. С ноотропным эффектом связывают усиление избирательного влияния на восприятие информации, улучшение консолидации памяти, повышение способности к обучению, увеличение адаптационных возможностей мозга.

Определение активности карбоксипептидазы E после введения пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа проводили в следующих отделах: гипофиз, гипоталамус, стриатум, гиппокамп, миндалевидное тело, четверохолмие, продолговатый мозг, надпочечники. Результаты определения удельной активности карбоксипептидазы E в нервной ткани и надпочечниках крыс представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Значения активности карбоксипептидазы E в нервной ткани и надпочечниках, нмоль/мин на 1 мг белка (- $p < 0,05$ по сравнению с контролем)*

Отдел мозга	Контроль	Опыт
Гипофиз	0,97±0,05	0,41±0,09*
Гипоталамус	0,16±0,04	0,34±0,06*
Стриатум	0,24±0,05	0,41±0,05*
Гиппокамп	0,17±0,03	0,40±0,04*
Амигдала	0,62±0,04	0,31±0,04*
Четверохолмие	0,27±0,04	0,55±0,05*
Продолговатый мозг	0,57±0,03	0,36±0,03*
Надпочечники	0,11±0,02	0,12±0,04

Согласно результатам проведенного исследования интраназальное введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к изменению активности карбоксипептидазы Е в нервной ткани крыс по сравнению с контролем:

- снижению на 58% в гипофизе,
- снижению на 50% в амигдале;
- снижению на 37% в продолговатом мозге;
- повышению в 2,1 раз в гипоталамусе;
- повышению в 1,7 раз в стриатуме;
- повышению в 2,35 в гиппокампе;
- повышению в 2 раза в четверохолмии.

Статистически достоверные различия в активности КПЕ в надпочечниках не установлены. Таким образом, установлено, что интраназальное введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа вызывает изменение активности карбоксипептидазы Е в отделах мозга крыс, но не влияет на активность фермента в надпочечниках, что может свидетельствовать о прямом воздействии на головной мозг без проникновения в системный кровоток.

При проведении исследований наличия прямого ингибирующего воздействия пептидов трутневого расплода на активность КПЕ в условиях *in vitro* к гомогенату гипофиза intactных крыс добавляли дистиллированную воду (контроль) или равный объем раствора пептидов, итоговое содержание которых составило 300 мкг/мл (опыт). При этом в контрольной пробе активность составила $0,93 \pm 0,07$ нмоль/мин на 1 мг белка, в опытной пробе – $0,96 \pm 0,06$ нмоль/мин на 1 мг белка. Установлено отсутствие достоверных отличий в значениях активности КПЕ в обеих пробах. Таким образом, влияние пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа на активность карбоксипептидазы Е в нервной ткани не связано с прямым воздействием на фермент. По-видимому, это связано с воздействием, опосредованным через ключевые нейромедиаторные системы.

Результаты исследования активности карбоксипептидазы Е в нервной

ткани представлены на рисунках 12-13.

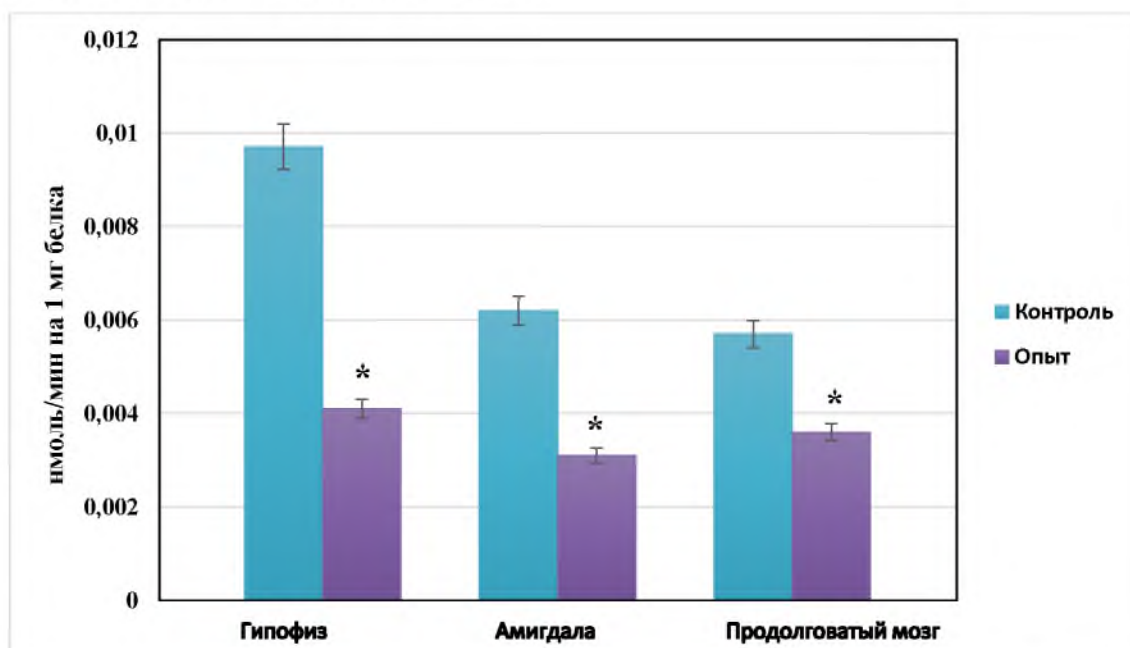


Рисунок 12. Показатели активности карбоксипептидазы E в гипофизе, амигдале, продолговатом мозге, нмоль/мин на 1 мг белка (*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

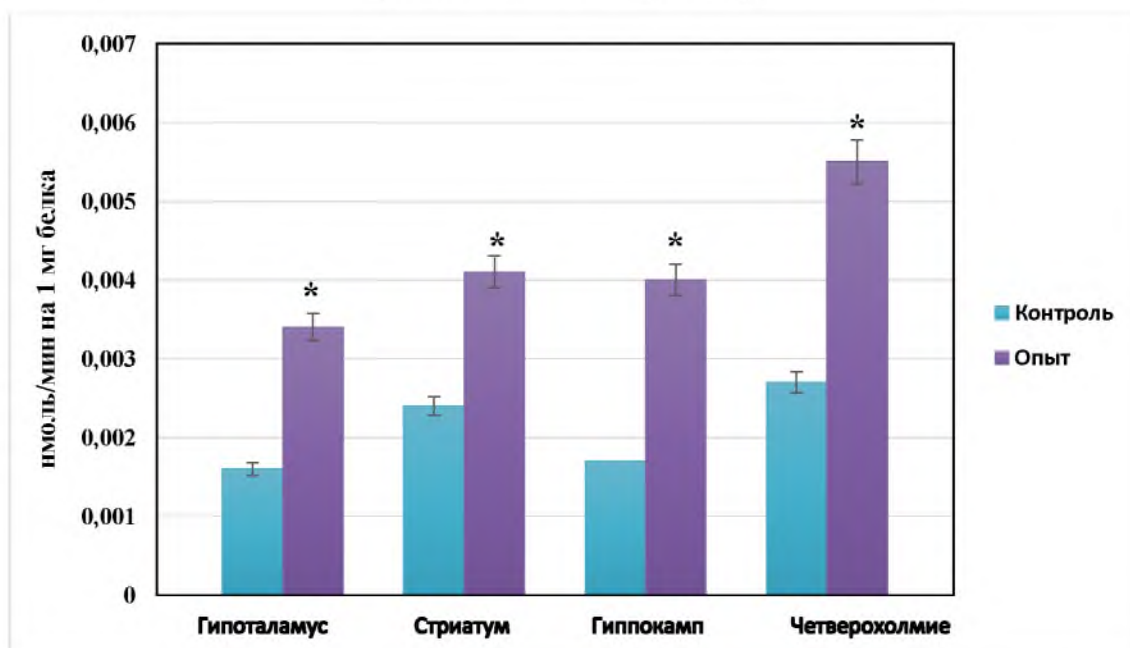


Рисунок 13. Показатели активности карбоксипептидазы E в гипоталамусе, стриатуме, гиппокампе, четверохолмии, нмоль/мин на 1 мг белка (*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Таким образом, ноотропный эффект пептидов трутневого расплода с

молекулярной массой 5-10 кДа может быть опосредован через изменение активности ключевого фермента обмена регуляторных пептидов – карбоксипептидазы E, и как следствие изменение уровня биологически активных форм широкого спектра регуляторных пептидов.

Выявлено снижение активности карбоксипептидазы E при интраназальном введении пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в гипофизе, амигдале и продолговатом мозге. В данных отделах мозга карбоксипептидаза E принимает участие в процессинге ряда важнейших регуляторных пептидов (CART, инсулин, α -меланоцитостимулирующий гормон, адренокортико- тропный гормон, нейропептид Y, мет- и лей-энкефалин, вазопрессин и окситоцин, соматостатин, ПОМК, амилин, холецистокинин, глюкагоноподобный пептид-1, переносчик дофамина, SAAS и др.) [77]. Высокое значение активности фермента является показателем активации процессов синтеза, созревания и сортирования данных регуляторных пептидов. Известно, что активация процессов и увеличение продукции нейропептидов, вовлеченных в ответную реакцию на стрессовое воздействие, может наблюдаться при хроническом стрессовом состоянии как механизм адаптации к нему.

В связи с этим, снижение ферментативной активности КПЕ в гипофизе, амигдале и продолговатом мозге крыс после введения пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа может являться маркером снижения синтетической активности данных отделов мозга и уменьшения образования стресс-индуцируемых регуляторных пептидов, что может лежать в основе снижения базового уровня тревожности. Похожие изменения в активности карбоксипептидазы E в гипофизе наблюдались при изучении влияния селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов на активность ферментов обмена регуляторных пептидов.

Кроме того, амигдала и продолговатый мозг играют важную роль в развитии и поддержании тревожного поведения. Являясь основным центром головного мозга, регулирующим реакции страха, тревоги и агрессии, амигдала

содержит значительное количество ГАМКергических нейронов, обеспечивающих баланс между возбуждением и торможением для нормального функционирования нервной системы, экспрессирующих рецепторы к большому спектру регуляторных пептидов, в том числе соматостатину [74]. Ключевым нейромедиатором для данного типа нейронов является гамма-аминомасляная кислота – основной тормозной нейротрансмиттер в ЦНС. Замирание животного во время опасности сопровождается активацией соматостатиновых нейронов в амигдале. Вместе с тем снижение активности карбоксипептидазы Е, принимающей участие процессинге данного регуляторного пептида, может влиять на его итоговое содержание в клетке.

Работа симпатического отдела вегетативной нервной системы регулируется продолговатым мозгом путем влияния на тонус поперечнополосатой скелетной мускулатуры и работу сердца. В исследованиях ряда авторов было установлено наличие ряда регуляторных пептидов (ВИП, нейропептид Y, холецистокинин, октапептид, нейротензин, кальцитонин-ген родственный пептид, энкефалин, тиротропинг-релизинг гормон, вещество Р) в нейронах продолговатого мозга [49]. Стоит отметить, что для большинства из них карбоксипептидаза Е является ферментом процессинга. Таким образом, снижение активности фермента ассоциировано с уменьшением содержания ряда регуляторных пептидов в этом отделе мозга и физиологически может проявляться уменьшением уровня тревоги и стресса у животных, что позволяет им быстрее адаптироваться к новым условиям.

Установлено повышение активности карбоксипептидазы Е при интраназальном введении пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в гипоталамусе, стриатуме, гиппокампе, четверохолмии. Известно, что стрессовое воздействие приводит к активации ГГНО, что представляет собой сложный нейроэндокринный процесс, направленный на регуляцию реакции организма на стресс и связанный в том числе с повышением секреторной активности гипоталамуса. Являясь частью лимбической системы, гипоталамус осуществляет регуляцию автономных функций, гормональную активность через

гипофиз, связан с формированием эмоциональных реакций.

При выполнении поведенческих тестов животные оказываются в новой для них обстановке. Четверохолмие принимает активное участие в ориентировании животных: верхние холмики – в зрительном, нижние – в слуховом ориентировании. Гиппокамп принимает участие в формировании новых воспоминаний, пространственной навигации, связан с памятью и обучением. Активация данных структур в новой обстановке может быть также связана с увеличением ферментативной активности ферментов процессинга регуляторных пептидов, в том числе карбоксипептидазы Е. Имеются сведения о том, что при выполнении поведенческих тестов животными происходит активация нейронных путей в гиппокампе для закрепления информации о пространственной навигации в новой обстановке, при этом регуляторные пептиды, такие как соматостатин и нейропептид Y участвуют в формировании ассоциативной памяти [21].

Известно, что стриатум участвует в обучении навыков и привычек, регуляции движений, контроле двигательной активности, обладает тормозной активностью по отношению к напряжённой мышечной мускулатуре [27]. Стрессовое воздействие приводит к возникновению тонуса мышц. Увеличение ферментативной активности в данном отделе может говорить об активации процессинга таких регуляторных пептидов как нейропептид Y, энкефалин, нейротензин и динарфин.

Выбор отделов мозга для проведения исследования был не случаен. Перечисленные структуры участвуют в формировании поведения, эмоций, памяти, мотивации, пространственном ориентировании и др. Компоненты лимбической системы обеспечивают формирование взаимосвязей между эмоциями, памятью и поведением, что позволяет животным легче адаптироваться к окружающей среде.

Пептидергическая система является крайне важной для регуляции работы других нейромедиаторных систем и формировании различных поведенческих реакций, обучении и др. Зачастую заболевания нервной системы связаны с

возникновением дисбаланса между различными нейротрансмиттерами и нейромодуляторами. При этом пептиды экзогенного и эндогенного происхождения способны влиять на работы отдельных компонентов. Таким образом, пептиды трутневого расплода представляют собой перспективные с точки зрения фармакологии соединения. Однако, данное направление исследований требует более детального изучения аминокислотного состава пептидов и их биологических эффектов на молекулярном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения магистерской диссертации было изучено и оценено наличие ноотропного эффекта пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа при введении лабораторным животным интраназально и внутрибрюшинно в течение 21 дня в тестах «Открытое поле с объектами» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». Проведено исследование активности карбоксипептидазы E в гомогенатах гипофиза, гипоталамуса, стриатума, гиппокампа, миндалевидного тела, четверохолмия и продолговатого мозга и надпочечников после 21 дня интраназального введения пептидов, а также проведены исследования наличия прямого ингибирующего действия на карбоксипептидазу E в условиях *in vitro*. Перечисленные структуры участвуют в формировании поведения, эмоций, памяти, мотивации, пространственном ориентировании и др. Компоненты лимбической системы обеспечивают формирование взаимосвязей между эмоциями, памятью и поведением, что позволяет животным легче адаптироваться к окружающей среде.

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие **выводы**:

1. Установлено, что метод выделения и очистки 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. Методы являются широко используемыми и могут быть применены для промышленного получения пептидов.

2. Обнаружено, что внутрибрюшинное и интраназальное введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к изменению поведения животных в тесте «Открытое поле с объектами»: увеличение вертикальной двигательной активности, времени выхода животных в центр арены, норкового рефлекса, времени груминга за счет увеличения продолжительности длительного груминга, снижение времени

фризинга и количества актов дефекации по сравнению с контролем. Данные изменения в поведении свидетельствуют о снижении общего уровня тревоги и стресса у животных и активации исследовательского поведения.

3. Выявлено, что внутрибрюшинное и интраназальное введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в течение 21 дня приводит к изменению поведения животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: уменьшению времени нахождения животных в закрытых рукавах установки, увеличению времени нахождения в открытых рукавах и центре без достоверных изменений параметров двигательной активности по сравнению с контролем. Таким образом, введение пептидов приводит к снижению уровня стресса, увеличению когнитивных функций и стимуляции умственной деятельности животных, повышению умственной работоспособности, концентрации внимания, что является прямым доказательством наличия ноотропного эффекта пептидов.

4. Установлено, что интраназальное введение пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа вызывает изменение активности карбоксипептидазы E в отделах мозга крыс, но не влияет на активность фермента в надпочечниках, что может свидетельствовать о прямом воздействии на головной мозг без проникновения в системный кровоток. Выявлено снижение активности карбоксипептидазы E в гипофизе, амигдале и продолговатом мозге, повышение активности в гипоталамусе, стриатуме, гиппокампе, четверохолмии.

Таким образом, пептидергическая система является крайне важной для регуляции работы других нейромедиаторных систем и формировании различных поведенческих реакций, обучении и др. Зачастую заболевания нервной системы связаны с возникновением дисбаланса между различными нейротрансмиттерами и нейромодуляторами. При этом пептиды экзогенного и эндогенного происхождения способны влиять на работы отдельных компонентов. Таким образом, пептиды трутневого расплода представляют собой перспективные с точки зрения фармакологии соединения. Однако, данное направление исследований требует более детального изучения аминокислотного состава

пептидов и их биологических эффектов на молекулярном уровне. Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение биологических эффектов пептидов на молекулярном уровне, а также на разработку практических рекомендаций возможного применения пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа в медицине или других сферах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болдырев А.А., Ещенко В.А., Илюха Е. И., Кяйвярайнен И. А. Нейрохимия // Учебное пособие для вузов. Москва: Дрофа, 2010, 398 с.
2. Бурчинский С. Г. Новые возможности ноотропной и вазотропной фармакотерапии в стратегии лечения цереброваскулярной патологии // Международный неврологический журнал. 2011. № 2. С. 14–17.
3. Вернигора А. Н., Генгин М. Т. Влияние этанола на активность растворимой и мембрано-связанной карбоксипептидазы Н в отделах головного мозга крыс при иммобилизационном стрессе // Вопросы медицинской химии. 1994. С. 54–56.
4. Возможности применения комбинированного препарата Омарон у больных с ишемическим инсультом, ассоциированным с артериальной гипертонией и атеросклеротическим стенозом сонных артерий / И. М. Смирнова, И. А. Лазукина, Н. И. Карелина, О. М. Поликутина, Н. С. Базуева, А. Н. Нехорошева // РМЖ. 2009. Т. 17, № 6.
5. Воробьева О. В. Ноотропные препараты – новые возможности известных лекарств // Consilium Medicum (Ревматология и неврология). 2008. Т. 10, № 2. С. 7–11.
6. Воронина Т. А., Середенин С. Б. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1998. № 4. С. 3–9.
7. Всемирная организация здравоохранения : сайт [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://www.who.int/ru/> (дата обращения: 15.04.2025).
8. Ганцгорн Е. В., Хлопонин Д. П., Макляков Ю. С. Патолофизиологические основы современной фармакотерапии острой ишемии головного мозга. Место ноотропов и антиоксидантов в нейропротекции // Медицинский вестник Юга России. 2013. № 2. С. 4–12.
9. ГОСТ Р 50258–92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. Москва : Московский печатник, 1994. 24 с.

10. Евтушенко И. С. Ноотропы и нейропротекторы в современной клинической нейрофармакологии // Международный неврологический журнал. 2013. № 3 (57). С. 20–27.
11. Илларионова Т. С. Место Фенотропила среди ноотропных препаратов // Трудный пациент. 2006. Т. 4, № 5. С. 23–26.
12. 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.
13. Клыченков С. В., Кручинина А. Д. Изучение влияния пептидов продуктов пчеловодства на активность пептидил-дипептидазы А в сыворотке крови и нервной ткани крыс в условиях хронического стресса // Технологии живых систем. 2023. Т. 20, № 2. С. 73–80.
14. Клыченков С. В., Кручинина А. Д., Гамзин С. С., Левашова О. А. Оценка изменений активности карбоксипептидаз под действием пептидов продуктов пчеловодства при хроническом стрессе // Вестник МГПУ. Серия: Естественные науки. 2023. № 3 (51). С. 24–36.
15. Ковалев Г. В. Ноотропные средства. Волгоград : Ниж.-Волж. кн. изд-во, 1990. 368 с.
16. Косарев В. В., Бабанов С. А. Фармакотерапия дисциркуляторной энцефалопатии: в фокусе – ноотропы // Медицинский совет. 2012. № 3. С. 54–59.
17. Миронов А. Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. Москва : Гриф и К, 2015, 592 с.
18. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Москва, : Гриф и К, 2012. Ч. 1. 944 с.
19. Нейрохимия : учеб. пособие для вузов / А. А. Болдырев, Н. Д. Ещенко, В. А. Илюха, Е. И. Кяйвярайнен. Москва : Дрофа, 2010. 398 с.
20. Оценка изменения активности карбоксипептидаз под действием пептидов продуктов пчеловодства при хроническом стрессе / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина, С. С. Гамзин, О. А. Левашова // Вестник МГПУ. Серия:

Естественные науки. 2023. № 3 (51). С. 24–36.

21. Применение Омарона у пациентов с постинсультными когнитивными расстройствами / В. А. Парфенов, Г. Р. Беллавина, Н. В. Вахнина, В. В. Гусев, Я. И. Левин, С. П. Маркин, Ю. А. Старчина // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2009. № 6.

22. Путилина М. В. Современные представления о ноотропных препаратах // Лечащий врач. Журнал для практикующего врача. 2006. № 5. С. 10–14.

22. Регистр лекарственных средств России : сайт [Электронный ресурс]. 2020–2021. URL: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 17.04.2025).

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

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

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

27. 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. Томск, 2011. 512 с.

28. An association study between the genetic polymorphisms within GnRHI, LH β and FSH β genes and central precocious puberty in Chinese girls / Y. Zhao, T. Chen, Y. Zhou, K. Li, J. Xiao // *Neurosci Lett*. 2010. Vol. 486, № 3. P. 188–192.

29. Anticipatory cortisol, testosterone and psychological responses to judo competition in young men / A. Salvador, F. Suay, E. Gonza'lez-Bono, M. A. Serrano // *Psychoneuroendocrinology*. 2003. Vol. 28. P. 364–375. doi: 10.1016/S0306-4530(02)00028-8

30. Bellparikh L. C., Eipper B. A., Mains R. E. Response of an integral

granule membrane protein to changes in pH // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 32. P. 29854–29863.

31. Borbély É., Scheich B., Helyes Z. Neuropeptides in learning and memory // Neuropeptides. 2013. Vol. 47, № 6. P. 439–450.

32. Carboxypeptidase E (CPE): immunocytochemical localization in the rat central nervous system and pituitary gland / D. R. Lynch, K. M. Braas, J. C. Hutton, S. H. Snyder // Journal of Neuroscience. 1990. Vol. 10. P. 1592–1599.

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

34. Clinical efficacy of piracetam in cognitive impairment: a meta-analysis / T. Waegemans, C. R. Wilsher, A. Danniau, S. H. Ferris, A. Kurz, B. Winblad // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 2002. № 13. P. 217–224.

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

36. Dhanvantari S., Loh Y. P. Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 38. P. 29887–29893.

37. Differential activation of CRF receptor subtypes removes stress-induced memory deficit and anxiety / C. Todorovic, J. Radulovic, O. Jahn, M. Radulovic, T. Sherrin, C. Hippel, J. Spiess // European Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 25, № 11. P. 3385–3397.

38. Effect of piracetam on cerebral glucose metabolism in Alzheimer's disease as measured by positron emission tomography / W. D. Heiss, I. Hebold, P. Klinkhammer, P. Ziffling, B. Szelies, G. Pawlik, K. Herholz // J. Cereb. Blood Flow Metab. 1988. № 8. P. 613–617.

39. Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain / W. E. Muller, S. Koch, K. Scheuer, A. Rostock, R. Bartsch // Biochem. Pharmacol. 1997. № 53. P. 135–140.

40. Fabiani G., Pastro P. C., Froehner C. Parkinsonism and other movement

disorders in outpatients in chronic use of cinnarizine and flunarizine // *Arq Neuro-Psiquiatr.* 2004. № 62 (3). P. 1590.

41. Fricker L. D. Carboxypeptidase E // *Annu Rev Physiol.* 1988. Vol. 50. P. 309–321.

42. General Principles of Preclinical Study Design / W. Huang, N. Percie du Sert, J. Vollert, A. S. C. Rice // In: *Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine* / A. Bespalov, M. Michel, T. Steckler. Handbook of Experimental Pharmacology. 2019. Vol. 257. P. 55–57.

43. 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

44. GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons / A. Pelsman, C. Hoyo-Vadillo, T. A. Gudasheva, S. B. Seredenin // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2003. № 21. P. 117–124.

45. Heinrichs M. B., von Dawans B., Domes G. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior // *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2009. Vol. 30, № 4. P. 548–557.

46. Hemsley K. M., Crocker A. D. Changes in Muscle Tone Are Regulated by D1 and D2 Dopamine Receptors in the Ventral Striatum and D1 Receptors in the Substantia Nigra // *Neuropsychopharmacology.* 2001. Vol. 25, № 4. P. 514–526.

47. Holsboer F., Ströhle A. *Anxiety and Anxiolytic Drugs.* Springer, 2005. 580 p.

48. Honek J. Preclinical research in drug development // *Communications Consulting & Medical Writing.* 2017. Vol. 26, № 4. P. 5–7.

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

50. Human carboxypeptidase E. Isolation and characterization of cDNA, sequence conservedness, expression and in vitro processing / E. Manser, D. Fernandez, L. Loo, P. Y. Goh, C. Monfries, C. Hall, L. Lim // *Biochem Journal.* 1990. Vol. 267. P. 517–525.

51. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals // Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011. P. 22.
52. Illum L. Nasal drug delivery – recent developments and future prospects // *J Control Release*. 2012. Vol. 2, № 161. P. 254–255.
52. Johnson R. L., Olive M. F. *Preclinical Psychopharmacology*.
54. Kastin A. J. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier, 2013. 2032 p.
55. Long-term and high-dose piracetam treatment of Alzheimer's disease / B. Croisile [et al.] // *Neurology*. 1993. № 43. P. 301–305.
56. Muller W. E., Eckert G. P., Eckert A. Piracetam: novelty in a unique mode of action // *Pharmacopsychiatry*. 1999. № 32 (Suppl 1). P. 2–9.
57. Neumann I. D., Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors // *Trends in Neurosciences*. 2012. Vol. 35, № 11. P. 649–659.
58. NeuroPedia: Neuropeptide database and spectra library : сайт [Электронный ресурс]. URL: <http://proteomics.ucsd.edu/Software/NeuroPedia/> (дата обращения: 25.04.2025).
59. Neuropeptide Y attenuates anxiety- and depression-like effects of cholecystokinin-4 in mice / S. J. Desai, C. D. Borkar, K. T. Nakhate, N. K. Subhedar, D. M. Kokare // *Neuroscience*. 2014. Vol. 277. P. 818–830.
60. 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 // *Article in Pharmacological Reviews*. 2015. № 67. P. 547–548.
61. Ohmura Y., Yoshioka M. The Roles of Corticotropin Releasing Factor (CRF) in Responses to Emotional Stress: Is CRF Release a Cause or Result of Fear/Anxiety? // *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*. 2009. Vol. 8, № 6. P. 459–469.
62. Online mental health services in China during the COVID-19 outbreak /

S. Liu [et al.] // *Lancet Psychiatry*. 2020. № 7 (4). P. 17–18.

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

64. Piracetam and vinpocetine exert cytoprotective activity and prevent apoptosis of astrocytes in vitro in hypoxia and reoxygenation / B. Gabryel, M. Adamek, A. Pudelko, A. Malecki, H. I. Trzeciak // *Neurotoxicology*. 2002. № 23. P. 19–31.

65. 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.

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

67. Siddiqui O., Chien Y. W. Nonparenteral administration of peptide and protein drugs // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1987. Vol. 3, № 3. P. 196–197.

68. Steinmetz K. L., Spack E. G. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications // *Proceedings of the 2009 Drug Discovery for Neurodegeneration Conference*. 2009. Vol. 9, № 1. P. 1–4.

69. Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H. Purification and characterization of membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, “enkephalin convertase” // *J. Neurochem*. 1984. Vol. 42, № 4. P. 1017–1023.

70. Takei Y., Ando H., Tsutsui K. *Handbook of Hormones*. Elsevier, 2016. 674 p.

71. The basolateral amygdale gamma-aminobutyric acidergic system in health and disease / E. M. Prager, H. C. Bergstrom, G. H. Wynn, M. F. Braga // *J. Neurosci. Res*. 2016. Vol. 96, № 6. P. 548–567.

72. Todorovic C. Differential activation of CRF receptor subtypes removes stress-induced memory deficit and anxiety // 2007. Vol. 25, №1. P. 3385 – 3397.

73. Van der Maaden K., Jiskoot W., Bouwstra J. Microneedle technologies

for (trans) dermal drug and vaccine delivery // J Control Release. 2012. Vol. 2, № 161. P. 645–647.

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

75. Walsh G. Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications. 2007. 499 p.

76. Waegemans T., Wildher C. R., Danniau A., Ferris S. H., Kurz A. Clinacal efficacy of piracetam in cognitive impairment: a meta – analysis // Dement/ Griatr. Cogn. 2002. 217-224.

77. Zhao Y., Chen T., Zhou Y., Li K., Xiao J. An association study between the genetic polymorphisms within GnRHI, LH β and FSH β genes and central precocious puberty in Chinese girls // Neurosci Lett. – 2010, – V 486, – N 3. – P. 188-192.