

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

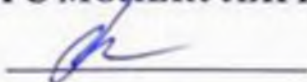
Магистерская программа Биохимия

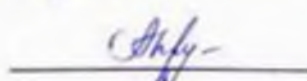
Форма обучения очная

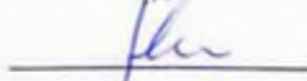
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«АНКСИОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ ТРУТНЕВОГО
РАСПЛОДА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 5-10 кДа»

Студент  Аширова Лейсан Азатовна

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 27.06.25 № 2)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Молекулярно - биохимические механизмы возникновения тревоги	6
1.2 Современные анксиолитики, классификация и механизмы действия	9
1.3 Молекулярные механизмы действия анксиолитиков.....	14
1.4 Роль пептидергической системы в регуляции тревоги	18
1.5 Методология доклинических исследований анксиолитических препаратов	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	26
2.1 Объект исследования	26
2.2 Выделение и очистка пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа.....	27
2.2.1 Ионообменная хроматография	29
2.2.2 Спектрофотометрическое определение концентрации пептидов.....	31
2.2.3 Гель – фильтрация	32
2.2.4 Электрофорез пептидов	33
2.3 Организация эксперимента на лабораторных животных	34
2.3.1 Тест « Открытое поле»	35
2.3.2 Тест «Тёмная/светлая камера».....	37
2.3.3 Определение активности ПДПА в нервной ткани и сыворотке крови.....	38
2.4 Статистическая обработка данных	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1 Результаты выделения и очистки пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа	40
3.2 Результаты оценки влияния пептидов трутневого расплода на поведение животных в тесте «Открытое поле»	43
3.3 Результаты оценки влияния пептидов трутневого расплода на поведение животных в тесте «Тёмная/светлая камера»	47

3.4 Определение активности пептидил-дипептидазы А в мозге и сыворотке крови	50
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	57

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Тревожные расстройства стали глобальной проблемой современного общества в связи с тем, что длительный стресс не только снижает качество жизни, но и провоцирует развитие хронических сердечно-сосудистых, иммунных, а также нейродегенеративных заболеваний. При этом нейрохимические механизмы, лежащие в основе развития тревоги, остаются недостаточно изученными. Современные исследования указывают на комплексный характер регуляции тревожного поведения, где одну из основных ролей играет пептидергическая система.

Анксиолитики представляют собой фармакологическую группу препаратов, направленных на уменьшение симптомов тревоги и стресса. Около 10–15% населения в мире ежегодно принимают синтетические анксиолитики, несмотря на наличие побочных эффектов и возможность развития зависимости [28]. Поиск безопасных природных альтернатив с анксиолитическим эффектом остается ключевым направлением современной фармакологии.

Продукты пчеловодства привлекают внимание исследователей в качестве уникального природного источника биологически активных веществ благодаря своему богатому биохимическому составу. Например, в трутневом расплоде обнаружены пептиды, гормоны (тестостерон), минералы (кальций, цинк) и деценовая кислота, которые обладают адаптогенными и нейропротективными свойствами. Пептиды являются перспективными агентами с анксиолитическим потенциалом и привлекают повышенный интерес научных исследователей. Поиск пептидов природного происхождения, способных модулировать тревожные состояния, остается перспективным направлением современных исследований.

Исследования показывают, что пептиды продуктов пчеловодства с массой менее 5 кДа демонстрируют ноотропный эффект, улучшая когнитивные функции и снижая стресс [23]. Действие пептидных препаратов

может быть опосредовано через модуляцию работы пептидергической системы мозга.

Пептидил-дипептидаза А — ключевой фермент, регулирующий метаболизм нейроактивных пептидов в мозге. Она контролирует их концентрацию на этапе созревания, осуществляя ограниченный протеолиз — избирательное расщепление пептидных связей. Это позволяет тонко настраивать активность нейропептидов, влияющих на нейронные процессы [34]. Изменение активности данного фермента служит индикатором функциональной нагрузки на пептидергические системы в различных областях мозга.

Недостаточная изученность биологических эффектов пептидов пчелопродуктов с молекулярной массой 5–10 кДа определяет новизну данного исследования.

Целью работы является изучения наличия анксиолитического действия пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Выделить и очистить пептидные фракции трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа с применением комбинации методов ультрафильтрации, ионообменной хроматографии, гель-фильтрации;
2. Провести тестирование анксиолитической активности *in vivo* с использованием тестов «Открытое поле», «Тёмная/светлая камера»;
3. Определить активность ПДПА в нервной ткани и сыворотке крови;
4. Провести статистическую обработку результатов.

Магистерская диссертация написана на 61 листах, содержит 6 рисунков, 5 таблиц и список литературы, состоящий из 52 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Молекулярно-биохимические механизмы возникновения тревоги

Тревога является естественным адаптационным механизмом, сигнализируя о возможных угрожающих изменениях во внешнем мире или в самом организме [26]. Механизмы развития тревоги на молекулярном уровне довольно сложны и включают в себя множество биохимических и нейрофизиологических процессов.

Тревожные расстройства остаются наиболее распространенной категорией нарушений в мире. По данным ВОЗ, в 2019 г. ими страдали 301 млн человек (около 4% населения планеты)[41]. К 2022 г. на фоне пандемии COVID-19 распространенность тревоги и депрессии выросла на 25%, что связано с социальной изоляцией и страхом заражения, а также экономической нестабильностью[43].

Создание новых поколений анксиолитиков, обеспечивающих редукцию симптоматики и повышение социальной адаптации пациентов, открыло новые перспективы в терапии данной патологии.

В современном научном дискурсе наблюдается терминологическая дихотомия при описании аффективных состояний «тревога» (англ. anxiety) и «тревожность» (англ. trait anxiety). Несмотря на синонимизацию, ряд авторов акцентируют дифференциацию этих конструктов, подчеркивая их разную смысловую нагрузку [17].

Под тревогой понимают негативное эмоциональное состояние, характеризующееся ожиданием неблагоприятного исхода текущей ситуации [3]. В ряде работ тревога описывается, как предрасположенность индивида переживать неопределенность, недостаточную информированность об условиях среды как ситуацию, сопряженную с возможной опасностью [48].

Патогенез эмоциональных реакций основывается на каскадной активации биологически активных соединений с последующим формированием комплексных нейрогуморальных взаимодействий. Данные

процессы проявляются через вегетативные дисфункции, нейроэндокринные реакции, изменения психомоторной активности и поведенческие реакции.

Современные данные позволяют утверждать, что нейрофизиологические и нейрохимические механизмы тревоги в настоящее время хорошо изучены. Многочисленные экспериментальные данные подтверждают, что тревожность связана с активностью структур лимбической системы. Данная система, являющийся филогенетически древним отделом переднего мозга, интегрирует совокупность корковых и подкорковых образований.

К корковым элементам относятся гиппокамп, парагиппокампальная и поясная извилины, обонятельные луковицы, орбитофронтальная и островковая кора, а также отдельные участки височной доли. Подкорковые структуры включают: миндалевидное тело, сеπτальные ядра, переднее таламическое ядро, преоптическую область, гипоталамус и мамиллярные тела [4].

Особое патогенетическое значение в формировании тревожных состояний отводится амигдаларному комплексу, выполняющему ключевую регуляторную функцию [50].

Нейронная активность его ядерных образований контролируется корковыми структурами, преимущественно префронтальной корой (ПФК), что подтверждает существование нисходящих регуляторных механизмов. В качестве возможных нейрохимических механизмов, отвечающих за тревожность, упоминается активность различных нейромедиаторных систем.

Многочисленные исследования выделяют критическую роль серотонинергической передачи, демонстрируя связь между полиморфизмом гена транспортера серотонина (5-НТТ) и выраженностью тревожной симптоматики [35].

Также имеются данные влияния дофаминергической системы: экспериментальные модели на грызунах выявили усиление

тревожноподобного поведения при искусственном снижении дофаминового уровня [17].

Кроме того, была обнаружена взаимосвязь между связывающей способностью дофаминовых рецепторов D2-типа ПФК и активностью амигдаллярного комплекса и других структур лимбической системы у испытуемых при просмотривании изображений негативной валентности [18].

Согласно ГАМК-бензодиазепиновой гипотезе, патологическая тревожность обусловлена снижением активности ГАМК-ергических рецепторов, приводящим к дисбалансу процессов нейронального торможения [11].

В ходе экспериментальных исследований на животных было установлено, что подавление ГАМК-ергической регуляции приводит к уменьшению ингибиторного воздействия на нейроны базолатерального отдела миндалины, что индуцирует их гиперактивацию и способствует формированию тревожных состояний [40].

Современные данные отмечают значимость катехоламинергических механизмов в патогенезе тревоги. Локализованное в стволовых структурах голубое пятно, содержащее значительное количество норадренергических нейронов, обладает обширными проекциями на различные области мозга.

В исследовании McCall et al. (2017) продемонстрировано, что стимуляция норадренергических путей голубого пятна вызывает функциональную активацию базолатерального отдела миндалины, подтверждая их роль в модуляции эмоциональных реакций [32].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что при стрессогенных воздействиях, ассоциированных с ростом ситуативной тревожности, норадренергические волокна голубого пятна опосредуют активацию БЛМ через β -адренорецепторы. Параллельно отмечается, что возбуждение нейронов данной области в условиях тревоги потенцирует активацию симпатoadреналовых механизмов, усиливая вегетативные проявления стресс-реакции [19].

Анализ роли гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы выявил, что гиперкортизолемиа модулирует синтез ключевых нейромедиаторов — серотонина и норадреналина. Дисрегуляция их метаболизма создаёт предпосылки развития тревожных расстройств через формирование нейрoхимического дисбаланса.

Нейробиологические механизмы эмоциональных состояний, включая тревожность, связаны с метаболической реорганизацией нейрональных сетей в эмоциогенных церебральных зонах. Данная перестройка не только инициирует формирование негативных аффективных состояний, но и запускает каскад соматовегетативных реакций, характерных для эмоционального стресса [27].

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

1.2 Современные анксиолитики, классификация и механизмы действия

Термин «анксиолитики» (от лат. «anxietas» — тревога + греч. «lytikos» —ослабляющий) объединяет группу психотропных веществ, также известных как «транквилизаторы» (лат. «tranquillo» — успокаивать), «атарактики» (греч. «ataraxia» — невозмутимость) или «психолептики» (седативные средства).

Данные препараты обладают способностью уменьшать выраженность тревожных состояний, страха, эмоционального напряжения и беспокойства, за счёт угнетения активности центральной нервной системы. Однако их применение может привести как психологической, так и физической зависимости [2].

Классификация анксиолитиков осуществляется на основе следующих критериев:

1. Химической структуре (например, бензодиазепины, азапироны);
2. Механизму действия (агонисты ГАМК-рецепторов, ингибиторы обратного захвата нейромедиаторов);
3. Фармакокинетическим и фармакодинамическим свойствам (скорость наступления эффекта, продолжительность действия).

С исторической точки зрения выделяют три поколения противотревожных препаратов:

1. Анксиолитики первого поколения. К данной группе относятся классические бензодиазепины, такие как:
 - Диазепам;
 - Алпразолам (торговое название — Ксанакс);
 - Лоразепам (Ативан).
2. Анксиолитики второго поколения. Включают препараты с разнонаправленными механизмами действия:
 - Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС): эсциталопрам (Лексапро), сертралин (Золофт);
 - Ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (ИОЗСН): венлафаксин, дулоксетин;
 - Агонисты ГАМК-рецепторов: прегабалин, габапентин;
 - Прочие средства: гидроксизин (вистарил, атаракс).
3. Анксиолитики третьего поколения. Представлены препаратами с инновационными мишенями, например:
 - Буспирон — частичный агонист 5-HT_{1A}-рецепторов, лишённый седативного эффекта и риска зависимости.

Данная классификация отражает эволюцию подходов к терапии тревожных расстройств: от неселективного угнетения ЦНС (первое поколение) до таргетной модуляции нейротрансмиттерных систем (второе и третье поколения). Каждый этап развития фармакотерапии сохраняет актуальность в контексте индивидуального подбора лечения.

В клинической практике транквилизаторы подразделяют на две категории, исходя из их влияния на цикл сна-бодрствования:

1. Ночные (седативно-снотворные) транквилизаторы.

Характеризуются выраженным анксиолитическим и снотворным действием, направленным на купирование тревоги, страха и нормализацию сна (Феназепам, Диазепам, Клоназепам, Нитразепам).

Применяются преимущественно в вечернее время из-за риска седации.

2. Дневные транквилизаторы.

- Обладают анксиолитическим эффектом без выраженного угнетения ЦНС, сочетая его с умеренной стимуляцией мозговой активности (Клобазам, Мексидол, Транксен).

Назначаются для терапии тревожных состояний в дневное время [13].

Машковский М.Д. в 1983 году систематизировал анксиолитики по химическому строению, выделив следующие группы:

- Производные бензодиазепина: диазепам, феназепам;
- Карбаминовые эфиры замещённого пропандиола: мепробамат;
- Производные дифенилметана: бенактизин, гидроксизин (Атаракс).
- Транквилизаторы иных химических групп: буспирон, мебикар, бензоклидин [13].

В 2015 году, Харкевич Д.А. предложил разделение транквилизаторов на основе их фармакодинамики:

1. Агонисты бензодиазепиновых рецепторов:

- Препараты, усиливающие активность ГАМК-ергической системы (диазепам, феназепам).

2. Агонисты серотониновых рецепторов (5-НТ₁A):

- Селективные модуляторы серотонинергической передачи (буспирон).

3. Вещества с разнонаправленным действием:

- Средства, сочетающие антигистаминный, холинолитический и анксиолитический эффекты (бенактизин) [25].

Работа исследователей НИИ фармакологии РАМН Воронина Т.А. и Середенина С.Б. расширила понимание механизмов действия транквилизаторов, включив:

- Модуляторы глутаматных рецепторов (NMDA, AMPA).
- Антагонистов нейрокининовых рецепторов (субстанция Р).
- Препараты, влияющие на нейропластичность (BDNF-опосредованные пути) [5].

Данная классификация представлена в табл. 1.

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

Механизм действия	Представители
Традиционные анксиолитики	
Прямые агонисты ГАМК _A -бензодиазепинового рецепторного комплекса (ГАМК — γ-аминомасляная кислота)	Производные бензодиазепина: • с собственно анксиолитическим действием (хлордiazепоксид, diaзепам) • с снотворным действием (нитразепам, флуни- нитразепам) • с противосудорожным действием (клоназепам)
Препараты разного механизма действия	Препараты разного строения — мебикар, мепробамат, оксидин и др.
Новые анксиолитики	
Частичные агонисты бензодиазепинового рецептора (БДР)	• имидазопиридины (алпидем, золпидем) • имидазобензодиазепины (имидазенил, бретазенил), дивалон, гидазепам

Таблица 1.Продолжение

Эндогенные регуляторы (модуляторы) ГАМК _A -бензодиазепинового рецепторного комплекса	Фрагменты эндозепинов (в частности DBI — Diazepambindinginhibitor, т. е. ингибитора связывания диазепама), производные β-карболина (амбокарб,карбацетам)
Агонисты ГАМК _B -рецепторного комплекса	Фенибут
Мембранные модуляторы ГАМК _A -бензодиазепинового рецепторного комплекса	Мексидол, афобазол, ладастен
Глутаматергические анксиолитики	• Антагонисты NMD_A-рецепторов (кетамин, фенциклидин) • Антагонисты AMP_A-рецептора (ифенпродил) • Лиганды глицинового участка (7-хлоркинуреновая кислота)
Серотонинергические анксиолитики	• Агонисты и частичные агонисты серотониновых 1_A-рецепторов (буспирон, гепирон, ипсапирон) • Антагонисты 1_C-, 1_D-рецепторов, 2_A, 2_B-, 2_C-рецепторов (ритансерин, алтансерин) • Серотониновых 3_A-рецепторов (закоприд, ондансетрон)

Как видно из данных таблицы 1, способность снижать тревогу не ограничивается «классическими» анксиолитиками. Подобный эффект характерен для препаратов, относящихся к различным клинко-фармакологическим группам, что объясняется их влиянием на ключевые нейромедиаторные системы, вовлечённые в патогенез тревожных расстройств.

К таким системам относятся:

- ГАМК-ергическая (тормозная передача сигналов);
- Серотонинергическая (регуляция эмоционального состояния);
- Глутаматергическая (нейропластичность и возбуждение);
- Нейропептидные пути (например, CRF, субстанция Р).

Этот феномен демонстрирует, что тревога как патологическое состояние полисистемна, а её терапия требует комплексного воздействия на различные звенья нейробиологических механизмов.

Современные анксиолитики, несмотря на разнообразие, остаются неидеальными инструментами терапии. Ограничения, связанные с побочными эффектами и толерантностью, подчеркивают необходимость исследований новых мишеней (CRF, глутамат) и разработки препаратов с улучшенным профилем безопасности. Интеграция нейробиологии, генетики и фармакологии открывает путь к персонализированному лечению тревожных расстройств.

1.3 Молекулярные механизмы действия анксиолитиков

Современные анксиолитики, включая бензодиазепины, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) и препараты новых поколений, демонстрируют эффективность за счет модуляции ключевых нейрохимических систем. Но их терапевтическое действие невозможно понять без детального анализа молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции нейрональной активности, синаптической передачи и нейропластичности.

В регуляции нейрохимических процессов мозга участвует множество медиаторов, формирующих сложную сеть взаимодействий. Из более чем 30 идентифицированных соединений ключевая роль в развитии депрессии и стрессовых реакций отводится трем биогенным аминам: норадреналину, серотонину и дофамину. Эти вещества регулируют эмоциональный фон и адаптационные механизмы.

Передача сигналов между нейронами, а так же ее перенос через синаптическую щель обеспечивается химическими посредниками — нейромедиаторами. Согласно современным представлениям биологической теории депрессии, хронический стресс приводит к дисбалансу в работе этих веществ, снижая их активность в синапсах. Действие антидепрессантов направлено на восстановление баланса нейромедиаторов. Препараты модулируют синтез, высвобождение или обратный захват биогенных аминов, тем самым нормализуют функции ЦНС. В отличие от них, анксиолитики фокусируются на снижении гипервозбудимости подкорковых структур, ответственных за генерацию тревоги. К таким структурам относятся лимбическая система (включая миндалевидное тело), таламус и гипоталамус.

Хорошо изучен на данный момент механизм действия бензодиазепиновых производных.

В мозге были обнаружены «бензодиазепиновые» рецепторы, которые тесно связаны с рецепторами γ -аминомасляной кислоты (ГАМК).

Гамма-аминомасляная кислота — главный тормозной нейромедиатор ЦНС, играющий центральную роль в патогенезе тревоги. Бензодиазепины, такие как диазепам и алпразолам, реализуют анксиолитический эффект через аллостерическую модуляцию ГАМК-А-рецепторов. Эти рецепторы представляют собой пентамерные лиганд-зависимые ионные каналы, состоящие из комбинаций субъединиц (α , β , γ , δ , ϵ , π).

Связывание бензодиазепинов с участком на стыке α - и γ -субъединиц усиливает аффинность рецептора к ГАМК, что увеличивает частоту открытия хлоридных каналов. Гиперполяризация мембраны нейронов

снижает возбудимость лимбических структур, включая миндалевидное тело и префронтальную кору, что коррелирует с уменьшением тревожного поведения. Данный механизм реализуется в структурах, регулирующих эмоциональные реакции (гиппокамп, миндалевидное тело). Разнообразие подтипов бензодиазепиновых рецепторов (например, BZ1, BZ2) объясняет вариабельность эффектов препаратов — от анксиолитического до миорелаксирующего.

Благодаря высокой липофильности, бензодиазепины быстро преодолевают гематоэнцефалический барьер, обеспечивая быстрое начало действия при пероральном приеме.

Метаболизм большинства препаратов происходит в печени с участием цитохрома P450. Например, диазепам трансформируется в активный метаболит — N-дезметилдiazепам (нордiazепам), период полувыведения которого превышает 48 часов. Это обуславливает кумуляцию при длительном применении и пролонгированный эффект. В отличие от них, мидазолам гидроксилируется с образованием неактивных конъюгатов, что минимизирует риск остаточных явлений, делая его предпочтительным в анестезиологии.

До 90% бензодиазепинов связываются с альбуминами плазмы, а их накопление в липидных депо объясняет длительное присутствие в организме. Экскреция осуществляется преимущественно через почки, поэтому при почечной недостаточности требуется коррекция дозы.

Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), такие как флуоксетин и сертралин, блокируют транспортер SERT, повышая концентрацию серотонина в синаптической щели. Участвует в контроле эмоциональных состояний через активацию множества рецепторов: 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃.

Особый интерес представляет 5-HT_{1A}-рецептор, локализованный в дорсальном ядре шва и лимбической системе. Его активация подавляет высвобождение глутамата и кортиколиберина, снижая гипоталамо-

гипофизарно-надпочечниковую (ГГН) активность. Антагонисты 5-HT₃-рецепторов (например, ондансетрон) демонстрируют эффективность при тревоге, индуцированной стрессом, за счет подавления возбуждающих сигналов.

Ключевой мишенью СИОЗС выступает серотониновый транспортер (SERT) — мембранный белок, ответственный за обратный захват нейромедиатора в пресинаптическое окончание. SERT входит в семейство натрий-зависимых транспортеров, куда также относятся переносчики норадреналина (NET), дофамина (DAT), ГАМК и глицина. Все они характеризуются консервативной структурой: 12 альфа-спиралей, формирующих трансмембранные домены, и N-гликозилированными участками, обеспечивающими стабильность белка. Ингибирование SERT блокирует реабсорбцию серотонина, продлевая его воздействие на постсинаптические 5-HT-рецепторы.

Интересно, что эволюционно данные транспортеры демонстрируют структурное сходство с переносчиками нутриентов, например, глюкозным транспортером GLUT1. Это указывает на универсальность механизмов трансмембранного перенаправления молекул — от нейромедиаторов до метаболитов. Такая гомология позволяет использовать методы структурного моделирования, разработанные для изучения GLUT, в исследованиях SERT, что ускоряет разработку новых антидепрессантов.

В отличие от бензодиазепинов, оказывающих мгновенный эффект, СИОЗС требуют 2–4 недель для достижения клинического ответа, что связано с постепенной десенситизацией пресинаптических 5-HT_{1A}-рецепторов и нейропластическими изменениями. Эти препараты реже вызывают седацию и зависимость, что делает их основой терапии хронических тревожно-депрессивных состояний.

Глутамат, основной возбуждающий нейромедиатор, участвует в формировании патологической тревоги через активацию NMDA- и AMPA-рецепторов. Антагонисты NMDA-рецепторов (кетамин) оказывают быстрый

анксиолитический эффект, потенцируя синаптическую пластичность за счет усиления синтеза мозгового нейротрофического фактора (BDNF)..

Современные исследования выявили новые мишени, которые находятся на стадии изучения:

- Нейропептиды. Антагонисты рецепторов кортиколиберина (CRF1) и агонисты нейропептида Y (NPY1) подавляют стресс-индуцированную тревогу.

- Эндоканнабиноидная система. Ингибирование FAAH-фермента повышает уровень анандамида, усиливая тоническое торможение через CB1-рецепторы.

- Ионные каналы. Модуляторы TREK-1 калиевых каналов и ASIC-кислотно-чувствительных каналов демонстрируют потенциал в терапии резистентных форм тревоги[12].

Молекулярные механизмы действия анксиолитиков охватывают широкий спектр взаимодействий — от прямой модуляции нейромедиаторных рецепторов до регуляции долгосрочной нейропластичности. В организме эти механизмы каждого из указанных классов анксиолитиков различаются и работают по-разному. Различные анксиолитические препараты могут быть эффективными, а может, и нет, в зависимости от типа тревоги и особенностей пациента.

1.4 Роль пептидергической системы в регуляции тревоги

Пептидил-дипептидаза А(ПДПА, ангиотензин превращающий фермент, АПФ; КФ 3.4.15.1) — представляет собой трансмембранный цинк-зависимый металлопротеаз, кодируемый геном ACE в длинном плече 17-й хромосомы (локус17q23.3)[33].

Первичная структура фермента включает два гомологичных каталитических домена (N- и С-домены), различающихся субстратной специфичностью. Каждый домен содержит консервативный мотив HEXXH, участвующий в координации иона цинка, критического для каталитической

активности. Третичная структура ПДПА, установленная методом рентгеновской кристаллографии, демонстрирует наличие гидрофобного трансмембранного якоря и экстрацеллюлярного гликозилированного участка, обеспечивающего взаимодействие с растворимыми субстратами.

Данный фермент относится к мембраносвязанным гликопротеинам, синтезируемым на поверхности эндотелиальных и эпителиальных клеток. Он есть практически во всех тканях организма, однако максимальная концентрация зафиксирована в легочной ткани, почечных структурах, кровеносных сосудах и семенниках. Незначительная часть энзима присутствует в кровотоке в свободной форме вследствие протеолитического отщепления от мембран эндотелиальных клеток [49].

Ферментативная активность проявляется в диапазоне pH 7.0–8.5, при изоэлектрической точке 5.1–5.2. Каталитический процесс требует присутствия ионов Zn^{2+} в активном центре и Cl^{-} в реакционной среде. Механизм действия аналогичен карбоксипептидазе А: ион цинка активирует молекулу воды, передавая протон остатку глутаминовой кислоты (Glu384), после чего осуществляет нуклеофильную атаку карбонильной группы пептидной связи. Далее Glu384 обеспечивает перенос протона для разрыва связи между атомами углерода и азота [44].

Основная функция ПДПА заключается в катализе отщепления С-концевого дипептида от ангиотензина I с образованием ангиотензина II — ключевого медиатора ренин-ангиотензиновой системы (РАС), регулирующего артериальное давление и водно-солевой баланс. Ингибиторы этого фермента активно применяются в клинической практике в качестве антигипертензивных средств, используемых для коррекции повышенного артериального давления. Параллельно фермент инактивирует брадикинин, усиливая вазоконстрикторные эффекты. Вне сердечно-сосудистой системы ПДПА участвует в процессинге нейропептидов, включая субстанцию Р, энкефалины и нейрокинин А, модулируя их сигнальные пути. В ЦНС фермент локализован в синаптических мембранах, глиальных клетках и

областях, ассоциированных с эмоциогенезом (амигдала, гиппокамп, префронтальная кора).

Также ПДПА играет важную роль в патогенезе тревожных расстройств. Она обусловлена способностью влиять на баланс нейропептидов. Ингибирование фермента повышает уровень субстанции Р — нейромедиатора, усиливающего стрессовые реакции через взаимодействие с NK1-рецепторами [45]. Одновременно снижение деградации энкефалинов модулирует опиоидную систему, оказывая анксиолитическое действие. Экспериментальные данные на моделях грызунов демонстрируют, что блокада ПДПА (например, каптоприлом) снижает тревожноподобное поведение в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»[40]. Клинические исследования выявили ассоциацию полиморфизма ACE I/D с вариабельностью ответа на терапию тревожных расстройств, подтверждая связь генетических вариантов фермента с эмоциональной регуляцией.

Современные ингибиторы ПДПА, изначально разработанные для лечения гипертензии, проявляют потенциал в коррекции тревожных состояний. Однако селективное ингибирование С-домена, ответственного за метаболизм нейропептидов, может минимизировать системные побочные эффекты. Нанотехнологические подходы (например, липосомальная доставка) направлены на повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера для целевого воздействия на ЦНС.

Таким образом, пептидил-дипептидаза А представляет собой многофункциональный фермент, интегрирующий гуморальную регуляцию и нейропептидный обмен. Её двойственная роль в модуляции тревоги открывает пути для дальнейшего изучения.

1.5 Методология доклинических исследований анксиолитических препаратов

Доклинические исследования на животных — ключевой этап в изучении эффективности и безопасности новых анксиолитических препаратов перед переходом к клиническим испытаниям [37]. Эти работы включают токсикологический анализ, выявление побочных эффектов и определение безопасных доз для человека. Основными нормативными документами выступают «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией Миронова А.Н. и Лекарственные средства для медицинского применения – Доклинические токсикологические и фармакокинетические исследования безопасности (ГОСТ 56702 2015)», регламентирующие проведение доклинических тестов.

Целью исследований является идентификация органов-мишеней для токсического воздействия, оценка его обратимости, а также изучение потенциальной тератогенности, мутагенности и канцерогенности препарата [47]. Безопасность проверяют через эксперименты с однократным и многократным введением вещества животным, что позволяет прогнозировать риски для человека. Такие данные критически важны для обоснования перехода к этапу тестирования на добровольцах.

Оценка побочных эффектов в доклинических исследованиях включает мониторинг изменений в поведении, физиологических показателях животных, а также анализ биомаркеров в крови и других биологических образцах.

Этические аспекты — обязательное условие как доклинических, так и клинических этапов. Это подразумевает гуманное обращение с лабораторными животными и защиту прав пациентов-добровольцев.

Для перехода к клиническим испытаниям требуется установление «безопасных доз» и уровня токсичности препарата. Ключевую роль играют данные «фармакокинетики» (взаимодействие препарата с организмом) и «фармакодинамики» (эффекты лекарства и ответные реакции организма),

которые позволяют прогнозировать его действие и оптимизировать режим дозирования [38]. Эти параметры критически важны для минимизации рисков для участников исследований.

Токсикологические исследования имеют ключевое значение для определения токсичности препарата и оценки рисков для человека. Их результаты служат основанием для допуска к клиническим испытаниям.

Фармакокинетика исследует процессы взаимодействия организма с лекарством: абсорбцию, распределение, метаболизм и выведение (ADME). Эти параметры определяют концентрацию действующего вещества в крови и его биодоступность, что напрямую влияет на терапевтическую эффективность.

Анксиолитики чаще всего вводятся перорально (таблетки, капсулы, растворы) — этот метод оптимален для пациентов. Выбор формы зависит от свойств препарата и целей лечения.

При пероральном применении препарата следует соблюдать интервалы между приемами в 4–6 часов, тогда как при внутримышечном введении минимальный промежуток между инъекциями составляет 2 часа. Отдельные рекомендации допускают однократное превышение стандартной терапевтической дозы [1].

Хотя пероральный путь считается наиболее удобным, безопасным и экономичным, альтернативные методы введения (например, парентеральные) могут иметь преимущества. Однако, пероральный прием требует строгого соблюдения пациентом режима (дозировка, кратность), а абсорбция препарата часто варьируется из-за влияния внешних и внутренних факторов (пища, pH желудка, метаболизм).

В современной практике инъекционный метод остается популярной альтернативой пероральному приему. Он обеспечивает быстрое начало действия лекарства (обычно за 20–30 минут), что особенно важно при необходимости срочного терапевтического эффекта. Кроме того, позволяет создать депо препарата и избежать проблем, связанных с высокой начальной

концентрацией препарата в плазме после его быстрого внутривенного введения [29].

Среди инновационных методов выделяются трансдермальное введение и применение через слизистые оболочки (спреи, капли). Эти варианты актуальны для пациентов с дисфагией, упрощая прием лекарств без необходимости проглатывания таблеток.

Трансдермальное введение — это способ введения препарата через кожу. Трансдермальные системы (пластыри) содержат активные компоненты, способные проникать через кожные покровы в кровеносное русло. В таких системах лекарственное вещество фиксируется в полимерной основе адгезивного слоя, контактирующего с кожей. Благодаря естественной диффузии через эпидермис действующее вещество поступает в системный кровоток, обеспечивая пролонгированный и равномерный терапевтический эффект. Данная технология позволяет поддерживать постоянную концентрацию препарата в крови, что особенно важно при длительной терапии.

Выбор способа введения анксиолитиков зависит от ряда факторов: состояния пациента, формы выпуска препарата, дозировки, риска побочных реакций. Наиболее распространенным методом остается пероральный прием, при котором лекарство абсорбируется через ЖКТ перед попаданием в зону воздействия.

При пероральном приеме лекарство проходит через печень, где подвергается метаболизму. Это приводит к снижению его концентрации в крови до попадания в системный кровоток. Внутривенное введение позволяет избежать данного процесса, повышая биодоступность препарата. После поступления в кровь вещество распределяется по тканям организма.

Перед клиническими испытаниями обязательны доклинические токсикологические исследования, направленные на оценку безопасности препарата. Они помогают разработать схему терапии с минимальной токсичностью и установить безопасную стартовую дозу для испытаний на

людях. На первом этапе изучают воздействие однократной дозы, затем переходят к режимам с повторным введением для выявления органов-мишеней, подверженных токсическому влиянию [34].

Все анксиолитики обладают широким спектром фармакологических свойств. Анксиолитический эффект присуще всем препаратам данного класса, но особенно выражено у феназепама, диазепама, хлордиазепоксида, лоразепама, меπροамата и амизила.

Седативное действие связано со снижением гипервозбудимости и двигательной активности. Наиболее сильным седативным эффектом отличаются феназепам, диазепам и лоразепам, тогда как у мезапама и мидазолама он минимален.

Миорелаксанта́ный эффект бензодиазепинов обусловлен снижением тонуса скелетных мышц. Умеренная релаксация считается преимуществом, так как уменьшает тревогу, связанную с мышечным напряжением. Например, диазепам обладает сильным миорелаксирующим действием, в отличие от дневных транквилизаторов. Однако избыточная релаксация может негативно влиять на когнитивные функции, подавляя инициативность и скорость принятия решений.

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

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

Для биофармацевтических препаратов с длительным фармакологическим или токсикологическим действием необходимо длительное наблюдение за животными из группы восстановления до тех пор, пока не будет достигнута обратимость эффектов.

Длительность повторных исследований зависит от ожидаемой продолжительности клинического эффекта и медицинских показаний. В большинстве случаев такие исследования для биофармацевтических препаратов занимают 1–3 месяца.

При терапии острых и краткосрочных состояний (менее 7 дней) достаточно исследований продолжительностью до 2-х недель для подтверждения эффективности и получения разрешения на выход препарата на рынок. Для хронических заболеваний, требующих длительного лечения, необходимы исследования до 6-и месяцев, чтобы собрать достаточные данные о безопасности и эффективности [36].

Дополнительно обязательна оценка нежелательной фармакологической активности препаратов на животных моделях для минимизации рисков.

При необходимости следует включить специальный мониторинг этих активностей в исследования токсичности и клинические исследования. А для оценки потенциальной токсичности препаратов используют функциональные показатели, которые могут быть исследованы в отдельных исследованиях или включены в план исследований токсичности [51].

Все подопытные животные подвергаются систематическим клиническим осмотрам, а по завершении эксперимента — детальному патологоанатомическому анализу. Однако следует помнить, что данные доклинических испытаний не обладают абсолютной прогностической ценностью для человека, что делает обязательными клинические исследования эффективности и безопасности препарата.

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

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования стали пептидные фракции трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа.

Выделение и очистка проводилась с использованием материально-технической базы лабораторий ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», с применением комбинаций методов ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации.

Образцы трутневого расплода были получены с частных пасек, расположенных в трех районах Пензенской области: Пензенском (пасека «Лесная поляна»), Кузнецком и Камешкирском.

В качестве исследуемой породы медоносных пчёл рассматривается «*Apis mellifera carnica*», также известная под названиями «Карника» или «Краинская». Характерными особенностями данной разновидности являются серая окраска тела, а также специфические морфологические параметры: средняя масса новорожденных особей при выходе из сотовых ячеек составляет 80-90 мг, а длина хоботка достигает 6,5-6,7 миллиметров.

Трутневый расплод представляет собой личиночную стадию развития мужских особей медоносных пчел, извлекаемую из сотовых ячеек. Этот продукт пчеловодства обладает высокой концентрацией биологически активных соединений.

Содержание протеина, редуцирующих сахаров, макро- и микроэлементов в трутневом расплоде и маточном молочке идентично. Но в отличие от него, трутневый расплод характеризуется уникальным соотношением белков, липидов и низкомолекулярных пептидов, отличается по показателям содержания ненасыщенных кислот (по показателю окисляемости), pH, массовой доли воды. В трутневом расплоде содержание деценовых кислот ниже, но выявляются значительно более

высокие уровни сульфгидрильных групп тестостерона, прогестерона и эстрадиола.

Маточное молочко является дорогостоящим продуктом. Получение гомогената трутневого расплода экономически выгоден, поскольку стоимость этого дополнительного продукта пчеловодства превышает затраты на его производство, что делает его перспективным объектом для исследований [16].

Так же следует отметить, что в отличие от синтетических анксиолитиков, пептиды трутневого расплода не вызывают побочных эффектов (например, таких как: седация, зависимость).

2.2 Выделение и очистка пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа

Для получения рабочего раствора 50 г трутневого расплода тщательно перемешивали со 100 мл воды. Первичную очистку проводили, пропуская смесь через ватный фильтр для устранения крупных частиц. На втором этапе выполнили вторичную фильтрацию с применением фильтра с «красной лентой», установленной в воронку Бюхнера, используя вакуумное оборудование для ускорения процесса.

Полученный раствор концентрировали для разделения на фракции, содержащие белки с массой 5-10 кДа. Фильтрацию осуществляли на специальной ультрафильтрационной системе MasterFlex, оснащенной мембраной Vivaflow. Процедура включала следующие шаги:

1. Первичная промывка мембраны. Промывка дистиллированной воды (0,5-1 объема исходного резервуара), для удаления загрязнений и консервантов;
2. Щелочная промывка мембраны. Обработка 0,5 Н раствором NaOH (0,5-1 объема исходного резервуара) для удаления остаточных загрязнений;

3. Вторичная промывка мембраны. Удаление остатков щелочи и мелких частиц дистиллированной водой в объеме, эквивалентном объему резервуара.

Далее, полученный концентрированный фильтрат поместили в герметичную стеклянную тару и заморозили для дальнейших исследований.

После завершения процесса мембранный блок промыли так же, как и перед использованием.

В данной работе использован метод ультрафильтрации с тангенциальным потоком, используемый в установке Vivaflow.

Исходный раствор из резервуара подаётся в мембранный модуль под воздействием давления, которое создаётся перистальтическим насосом. Это давление обеспечивает фракционирование частиц раствора. Молекулы массой больше 5 кДа (пороговое значение определяется характеристиками полупроницаемой мембраны) задерживаются фильтрующим элементом и рециркулируются в резервуар. Низкомолекулярные соединения (менее 5 кДа) проникают через мембрану и поступают во второй резервуар [21].

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

Это достигается за счёт того, что поток жидкости, создаваемый перистальтическим насосом, течёт вдоль поверхности мембраны со стороны резервуара и очищает молекулы, которые из-за своего размера не могут проникнуть в поры мембраны.

Сочетание процесса фильтрации и очистки мембраны, который осуществляется параллельно с методом тангенциального потока, позволяет концентрировать отфильтрованный раствор. Это происходит за счёт медленного, но стабильного удаления растворителя через мембрану.

Таким образом, целевые частицы с массой, превышающей 5-10 кДа, практически не теряются и за счет этого, достигается отток молекул растворителя.

2.2.1 Ионообменная хроматография

Для ионообменной хроматографии использовали DEAE-целлюлозу— крупнопористый, слабый анионообменник, используемый для разделения белков и олигонуклеотидов. Она представляет собой белый, сухой, мелкозернистый порошок, который требует предварительную преформирование и промывку.

Преформирование необходимо для устранения водородных связей, формирующихся между гранулами целлюлозы при сушке. Эти связи препятствуют эффективному разворачиванию ионогенных групп, что негативно сказывается на способности матрицы к сорбции разделяемых веществ. Таким образом, проведение преформирования позволяет устранить проблемы и обеспечить оптимальные условия для дальнейшей хроматографической сорбции.

DEAE-целлюлозу с массой 3 г залили большим количеством дистиллированной воды и оставили для набухания на 24 часа, из-за низкой способности материала к набуханию. После настаивания ионообменник перемешали для осаждения гранул целлюлозы, после чего удалили примеси и неосевшие частицы методом декантации.

Процедуру повторили три раза: добавляли свежей дистиллированной воды, отстаивали смесь и сливали надосадочную жидкость до полного удаления видимых загрязнений.

Преформирование DEAE-целлюлозы включает следующие этапы:

1. Набухшие гранулы перемешивают, дают им осесть на дно сосуда, удаляют надосадочную жидкость;
2. Заливают 0,5 М раствором HCl (45–60 минут) для ионизации ионогенных групп;
3. Осторожно промывается ионообменник до pH ~ 4 (либо на фильтре, либо путём нескольких циклов перемешивания–декантации и добавления воды).

Промывку не доводят до нейтральных значений pH, так как ионы OH^- замещают ионы Cl^- в группах, что может привести к обратному подкислению раствора и значительному увеличению времени промывки.

Следующий этап:

4. Замещение иона Cl^- на OH^- : делается это путем погружения в 0,5 М раствор NaOH на 45–60 минут;

5. Финальная промывка. Ионообменник промывается, но уже до нейтрального pH. На этом этапе исключено обратное закисление или защелачивание раствора.

Подготовка колонки для ионообменной хроматографии с DEAE-целлюлозой (диаметр 1,75 см, объём носителя 6,5 мл):

1. На дно колонки помещается бумажный фильтр для предотвращения вымывания сорбента из колонки;
2. Нанесение носителя:
 - Суспензия DEAE-целлюлозы поэтапно вносится в колонку, избегая неравномерной укладки.
 - После каждой заливки частицы аккуратно перемешиваются для формирования равномерного распределения сорбента.
3. После достижения необходимого объёма сорбента (6,5 мл) столбик аккуратно перемешивается и накрывается фильтровальной бумагой. Это делается для предотвращения возможного колебания уровня осевших частиц во время внесения образца. В результате выполнения этих шагов DEAE-целлюлоза равномерно распределяется в стеклянной колонке, что обеспечивает эффективную ионообменную хроматографию.

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

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

В процессе хроматографии собирали фракции с объёмом 2 мл; после сбора восьмой фракции буферный раствор заменяли.

После сбора фракций колонку уравнивали исходным буфером, плотно закрывали пробкой для предотвращения подкисления CO₂ воздуха и угольной кислоты, образующейся из протонов буфера, и хранили в холодильной камере.

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

Контроль содержания примесей осуществляли спектрофотометрически по присутствию фруктозы в реакции с резорцином в кислой среде [45], концентрацию белковых компонентов во фракциях определяли методом Лоури [42] (в обоих случаях использовали метод калибровочной прямой: по фруктозе и БСА соответственно).

2.2.2 Спектрофотометрическое определение концентрации пептидов

Концентрация пептидов была определена спектрофотометрически. Спектрофотометрический анализ проводился путём измерения поглощения при длине волны $\lambda = 280$ нм, основан на поглощении ароматических аминокислот — триптофана (279 нм) и тирозина (274 нм), входящих в состав белков и пептидов.

Для определения концентрации исследуемый раствор помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и измеряли оптическую абсорбцию при длине волны $\lambda = 280$ нм против контроля (чистый растворитель). Полученные данные применяли для:

1. Построения профиля элюции пептидов после хроматографии;

2. Расчета концентрации методом калибровочной кривой (диапазон концентраций от 10 мкг/мл - 100 мкг/мл) с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

2.2.3 Гель фильтрация

Для концентрирования раствора пептидов после ионообменной хроматографии был применен:

1. Метод выпаривания. Фракции, содержащие очищенные от углеводов пептиды, были объединены в один стеклянный стакан. Затем он был помещен в сухой воздушный термостат при температуре 40 °С до полного испарения раствора. После полученный сухой остаток растворяли в 1 мл дистиллированной воды.
2. Гель-фильтрация. Этот метод основан на том, что молекулы солей задерживались в порах, тогда как пептиды элюировались быстрее.

В качестве носителя в данном исследовании использовался сефадекс, частицы которого имеют постоянный размер пор. Молекулы меньшего размера и массы проходят через гранулы, а также между гранулами, поскольку они элюируются через носитель вместе с подвижной фазой. В результате общий путь, пройденный этими молекулами, оказывается больше, чем у более крупных молекул, которые не проходят через поры носителя. Обессоливание проводили на колонке, заполненной сефадексом G-25 (диаметр колонки 7 мм, объём носителя — 14 мл).

Носитель готовили следующим образом: 2 г сухого порошка сефадекса засыпали в дистиллированную воду и оставляли набухать на 4-5 часов, после чего проводили несколько циклов перемешивания и декантации, чтобы удалить неосевшие частицы, фрагменты гранул и прочих примесей.

Набухший чистый гель заливали в колонку с фильтровальной бумагой на дне для предотвращения потери геля.

Колонку непрерывно заполняли элюентом, контролируя осаждение геля для предотвращения резких изменений плотности. По достижении требуемого объёма процесс останавливали, выравнивали скорости подачи и оттока элюента, затем проводили длительную промывку для уравнивания. После этого над гелем размещали фильтровальный бумажный диск, который исключал колебания уровня при элюировании и внесении образца. Образец наносили тонким слоем элюента, едва видимым, обеспечивая его полное погружение в гель.

На гель аккуратно нанесли 1 мл концентрированного раствора белков, пептидов, а также натриевую соль лимонной кислоты и саму кислоту. После того как образец диффузно впитался в гель, провели элюирование дистиллированной водой, собирая фракции по 2 мл. По окончании процесса колонку длительно промывали и хранили в холодильнике. Концентрацию пептидов определяли спектрофотометрически ($\lambda = 280$ нм), а цитрат-ионов — методом осаждения хлорида кальция.

2.2.4 Электрофорез пептидов

Для оценки молекулярной массы пептидных фракций трутневого расплода использовали электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в денатурирующих условиях по методу Лэммли.

Разделяющий гель 20%-й концентрации готовили на основе 1,5 М буферного раствора Трис-HCl (pH = 8,8), а концентрирующий 7% гель — на основе 0,5 М буферного раствора Трис-HCl (pH = 6,8). Перед электрофорезом образцы смешивали с буфером для загрузки (50 мМ Трис-HCl, pH = 6,8, содержащий: 0,5% SDS; 2 мМ ЭДТА; 0,01% красителя кумасси G-250; 12% - й раствор глицерина) в соотношении 1:1 и инкубировали на кипящей водяной бане 10 минут. Электрофоретическое разделение выполняли в системе Mini-Protean при постоянном токе 30 мА.

Для определения молекулярной массы в ходе каждого электрофореза применяли стандарты Sigma Aldrich со сверхнизким масс-диапазоном (1,06–

26,6 кДа). По завершении разделения гелевые пластины промывали дистиллированной водой, после чего фиксировали в течение 30 минут в смеси, содержащей: 0,2 М раствора ацетат натрия, 30%-й раствор этанола и 0,2%-й раствора глутарового альдегида.

После фиксации гелиевые пластины окрашивали 0,1% раствором кумасси R-250, приготовленным на основе 30%-го раствора метанола и 5%-ой уксусной кислоты, в течение 30 минут. Для удаления фона пластины инкубировали 12 часов в смеси 30%-го раствора этанола и 5%-й уксусной кислоты. Обработанные пластины геля сканировали с помощью лазерного сканирующего устройства, после чего проводили анализ данных в программе ImageJ с использованием макросов MolWt.

2.3 Организация эксперимента на лабораторных животных

Исследование проводили на 24 самцах беспородных крыс (5-6 месяцев, массой 290–300 грамм) в соответствии с протоколом доклинических исследований [14]. Животные содержались в стандартных условиях вивария, при естественном освещении, относительной влажности воздуха 40–50% и температуре 22–24°C, на стандартном рационе для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258–92) [7].

Крыс разделили на 4 группы (n=6). Животные контрольной и экспериментальной группы были размещены в разных отсеках. Условия содержания и проведения экспериментов соответствовали ГОСТ 34088–2017[6].

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

4. Крысам из опытной группы (Опыт 2) внутрибрюшинно вводились 1 мл раствора пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа из расчёта 500 мкг/кг массы тела.

Пептиды трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа и 0,9%-ый раствор NaCl опытным и контрольным группам вводили однократно, ежедневно с 9:00-11:00 ч. в течение 21 дня. Тесты проводили после 30 минут введения пептидных фракции трутневого расплода.

Согласно руководствам по проведению доклинических исследований, оценка анксиолитической активности требует применения методов, позволяющих оценить поведение животных.

Анксиолитическая активность *in vivo* была изучена при помощи тестов: «Открытое поле», «Тёмная/светлая камера».

После проведения поведенческих тестов животные были выведены из эксперимента путём декапитации на гильотине с последующим сбором крови в вакуумные пробирки LumiMed. Из образцов крови была выделена сыворотка путём центрифугирования при 2000 g в течение 15 минут.

В сыворотке крови и в нервной ткани *in vitro* была определена активность ПДПА.

2.3.1 Тест «Открытое поле»

Тест «Открытое поле» — один из наиболее широко используемых методов для оценки тревожности, исследовательской активности и двигательных функций у грызунов. Метод был Разработан в 1934 году, Кэлвином Холлом, он основан на естественном конфликте между стремлением животных к изучению новой среды и избеганием открытых, потенциально опасных пространств [9].

Арена для теста представляет собой круглую площадку диаметром 500 мм и высокими стенками 300 мм, исключающий побег. Поверхность пола разделена на 9 квадратов (100×100 мм) с 16-ю равномерно распределенными отверстиями. Для имитации естественных укрытий в камере нарисованы

круги с углублениями 2 см, напоминающие «норки». Такая модификация стимулирует исследовательскую активность, позволяет оценить предпочтение животных между безопасными зонами и открытым пространством.

Освещение в помещении поддерживается на уровне 300 люкс, что создает умеренный стресс, усиливающий избегание центральной зоны.

Предварительно крыс перед экспериментом в течение 3-х минут выдерживали в темноте, после чего помещали на один из квадратов периметра открытого поля. Сессии записываются на видео для последующего анализа.

В течение 10 минут наблюдения регистрировали:

1. Тревожность.
 - Время, проведенное в центре арены.
 - Латентность первого выхода в центр.
 - Количество дефекаций/мочеиспусканий (маркеры стресса).
2. Исследовательскую активность.
 - Вертикальная активность (стойки на задних лапах).
 - Груминг (уход за шерстью).
 - Исследование отверстий и углублений («норки»).
3. Двигательные функции.
 - Паттерны движения (кружение).
 - Эпизоды замиранья (фризинг).
4. Горизонтальную активность.
 - Число пересеченных квадратов в периферийной и центральной зонах (отдельно).
5. Вертикальную активность.
 - Количество стоек на задних лапах (исследование пространства).

Перед каждым тестом арену очищали для устранения запаха. Для минимизации стресса эксперимент проводили в звукоизолированном помещении с контролируемой температурой.

2.3.2 Тест «Тёмная светлая камера»

Тест «Тёмная/светлая камера» — широко применяемый метод оценки тревожности и исследовательской активности грызунов, основанный на их врождённом стремлении избегать ярко освещённых зон. Методика позволяет количественно оценить конфликт между страхом нового и любопытством, что делает её ключевым инструментом для изучения стрессовых воздействий [29]. Высокая стандартизация и короткая продолжительность теста способствуют его популярности в доклинических исследованиях.

Для проведения теста используется камера, она состоит из двух неравных частей:

- Тёмный отсек (1/3 площади) — закрытое пространство с минимальным освещением (менее 10 люкс), имитирующее безопасное укрытие.
- Светлый отсек (2/3 площади) — открытая зона с интенсивным освещением (300 люкс), создающим умеренный стресс.

Отсеки разделены перегородкой с прямоугольным отверстием шириной менее 7 см, через которое животное может свободно перемещаться. Освещение светлой части обеспечивается настольной лампой, расположенной на высоте 25 см над отсеком. Для минимизации внешних помех эксперимент проводили в звукоизолированном помещении с контролируемой температурой (22–24°C) [29].

Тест длится 5 минут, перед началом сеанса крысу помещали в переход между отсеками, разворачивая головой в сторону тёмной зоны. Регистрировались такие параметры, как:

1. Тревожность.

- Латентное время первого выхода в светлый отсек (сек).
- Общее количество выходов в светлую зону.
- Продолжительность пребывания в светлом отсеке (сек).

2. Исследовательская активность.

- Количество выглядываний из тёмного отсека (частичное проникновение в светлую зону без полного перехода).
- Активность в тёмном отсеке (перемещения, груминг).

После каждого испытания камеру очищали 70% этанолом для устранения запаха.

2.3.3 Определение активности ПДПА в нервной ткани и сыворотке крови

Изучение ферментативной активности играет ключевую роль в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе физиологических и патологических процессов. Одним из важных объектов исследований в нейробиологии и биохимии являются протеолитические ферменты, такие как пептидил-дипептидаза А (ПДПА), участвующие в регуляции метаболизма нейропептидов, клеточной сигнализации и поддержании гомеостаза тканей. Этот фермент может влиять на уровень тревожности, что актуально для поиска новых анксиолитических препаратов.

Активность ПДПА была определена в нервной ткани и сыворотке крови по следующей схеме:

1. Опытная группа - к 40 мкл гомогената ткани или сыворотки крови вносили 20 мкл 100 мМ Трис-НСl (рН = 7,6);
2. Контрольная группа - к аналогичному объёму образца добавляли 20 мкл 35 мкМ раствора каптоприла, растворённого в 100 мМ Трис-НСl (рН = 7,6). После 8 минутной предварительной инкубации при 37 °С к пробам добавили 10 мкл 5 мМ раствора карбоксибензоил-гли-гли-арг, приготовленного на том же буферном растворе, с последующей двухчасовой инкубацией при 37 °С;

Для остановки реакции использовали 30 мкл 10%-го раствора ТХУ.

Пробы центрифугировали 30 минут при 4000 об/мин, после чего в 50 мкл супернатанта количественно определяли содержание гли-арг нингидриновым методом на КФК-3 [27].

Концентрацию белка в образцах определяли по методу Лоури. Расчёт ферментативной активности проводили путём вычитания количества продукта в контроле из опытных значений, выражая результат в нмоль гли-арг, образованного за минуту инкубации на 1 мкг белка.

2.4 Статистическая обработка данных

Для оценки соответствия данных нормальному распределению применяли тест Шапиро-Уилка. Сравнение различий между группами с нормальным распределением выполняли с помощью t-критерия Стьюдента, а для сравнения выборок без предположения о нормальности использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Величины стандартного отклонения вычисляли как меру вариативности средних значений. Все статистические операции осуществляли с использованием программного обеспечения LibreOffice Calc.

Каждый эксперимент включал три повторности. Пороговым значением для определения статистической значимости различий служил уровень $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение пептидных фракций из раствора гомогената трутневого расплода проводилось на базе кафедры «Общая биология и биохимия».

3.1 Результаты выделения и очистки пептидов трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа

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

Для этой цели, без изменения параметров колонки, производилась хроматография с пробным объемом 0,75, 0,5 и 0,35 мл. Профили элюции представлены на рисунках 1,2,3.

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

Экспериментальные данные подтвердили, что оптимальным является объем 0,5 мл, при котором связанный белок и несвязанный пептид находятся в относительном равновесии.

Использование объема 0,35 мл нецелесообразно для дальнейшего анализа, так как выход белка слишком мал.

Для количественной оценки выхода белков и пептидов трутневого расплода после очистки от углеводов методом ионообменной хроматографии рассчитывали концентрацию белка в каждой фракции по значениям оптической плотности с использованием калибровочной кривой. Профили элюции по концентрации показаны на рисунках 4,5 и 6.

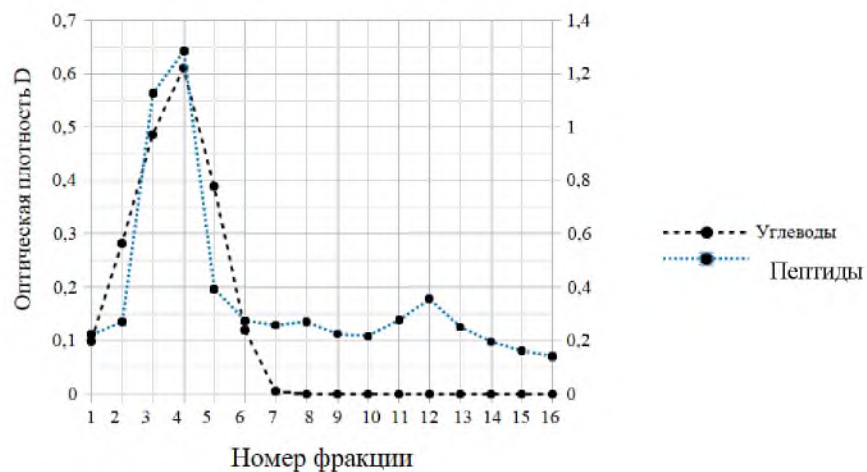


Рисунок 1. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,75 мл

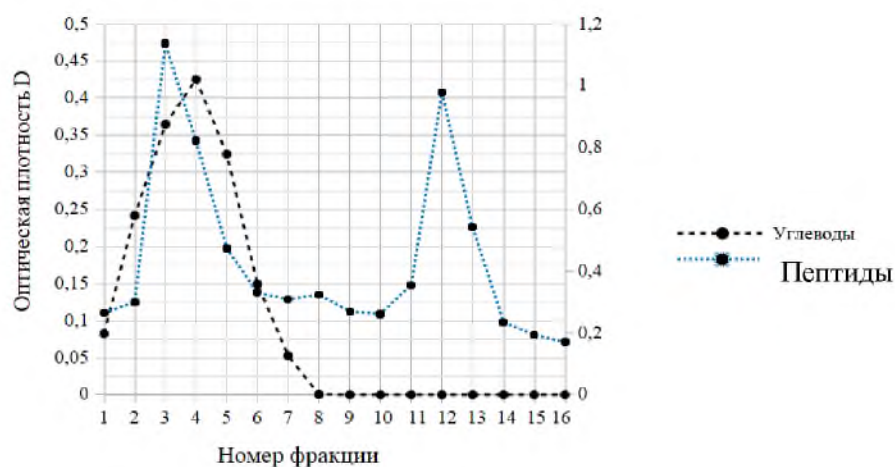


Рисунок 2. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,5 мл

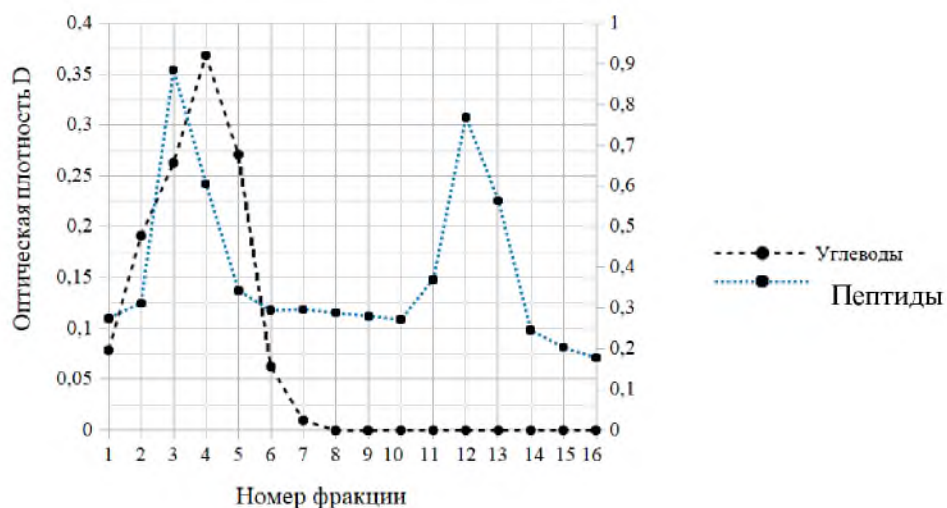


Рисунок 3. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,35 мл

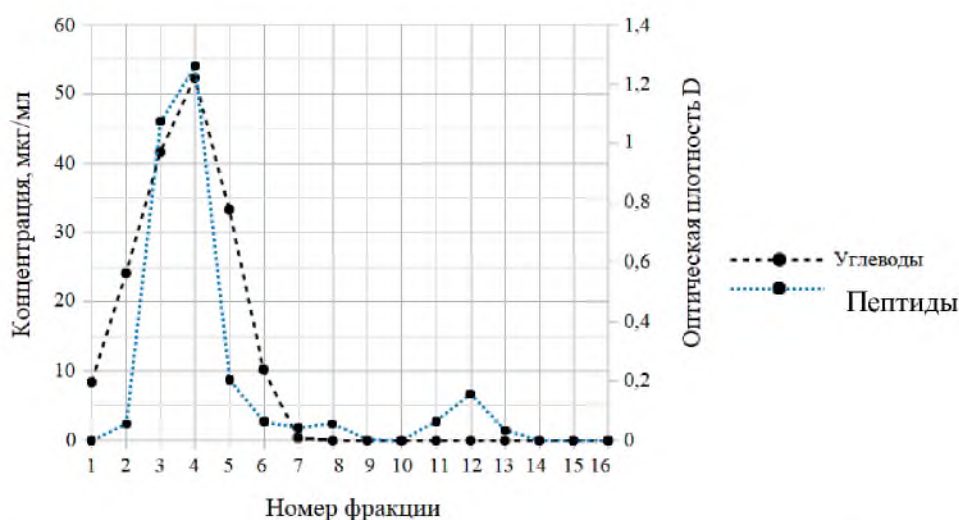


Рисунок 4. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,75 мл по концентрации белка

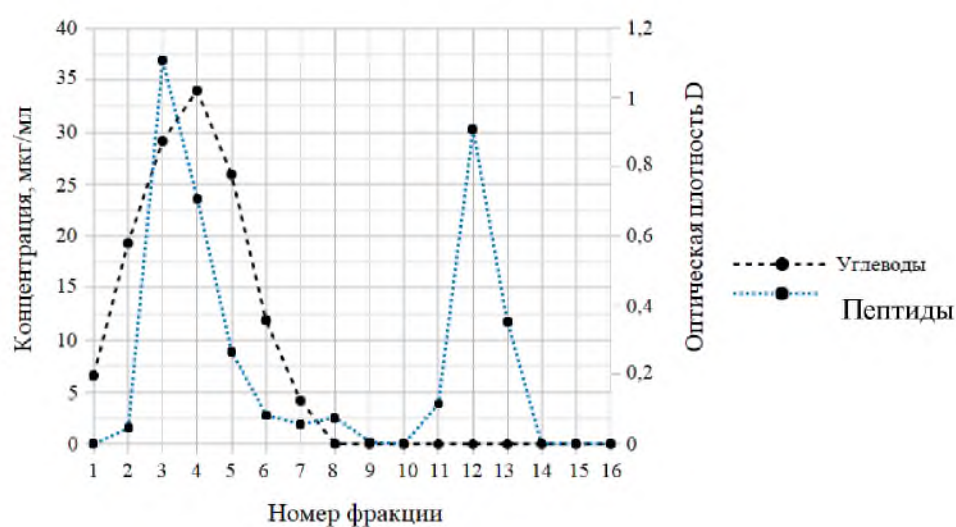


Рисунок 5. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,5 мл по концентрации белка

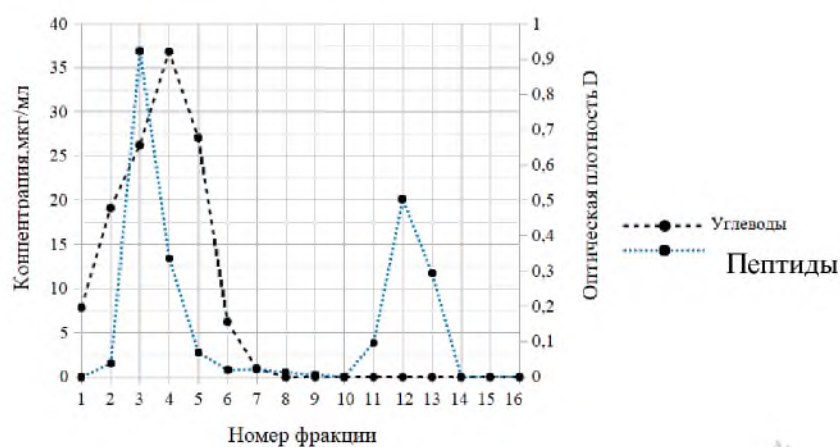


Рисунок 6. Профиль элюции пептидов и углеводов при объеме пробы 0,35 мл по концентрации белка

Определение выхода пептидов после хроматографии определяли путем измерения оптической плотности с дальнейшим расчетом концентрации. Концентрация рассчитывалась по калибровочным кривым, построенным на основе разведений стандартного раствора БСА.

Очистка пептидов от углеводов проводилась при постоянных параметрах хроматографической системы: ионообменная колонка с высотой 6,5 см и диаметром — 1,75 см.

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

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

3.2 Результаты оценки влияния пептидов трутневого расплода на поведение животных в тесте «Открытое поле»

Анализ поведения животных – важный этап для изучения когнитивных и эмоциональных процессов.

В тесте «Открытое поле» были получены результаты, отражающие поведения крыс:

- пространственная ориентация (перемещение по периметру и центру арены);
- исследовательская активность (горизонтальная и вертикальная двигательная активность, исследование отверстий);
- стресс-реакции (фризинг, груминг, уровень дефекаций).

Первоначальная реакция грызунов на новую среду характеризуется неофобией - животные демонстрировали тенденцию перемещения вдоль стен, избегали открытых пространств. По мере адаптации и снижения тревоги наблюдалось постепенное освоение центра арены, что служит важным индикатором эмоционального состояния.

Таблица 2. Количественные показатели поведения животных в тесте «Открытое поле»

Параметр, с	Группа животных			
	Контроль 1	Опыт 1	Контроль 2	Опыт 2
ГДА в центре арены	65,16±0,7	110,16±1,5*	73,26±0,5	102,05±1,5*
ГДА в периферии	416±0,5	495±1,1*	412±0,5	470±1,8*
Общая ВДА	7,8±0,56	20±0,1**	9,7±0,81	20±0,9**
Норковый рефлекс	210±3,6	110±0,5**	420±3,6	90±0,4**
Грумминг	132±0,81	60±1,8*	140±1,1	85±1,8*
Дефекация	10	4**	11	7**
Фризинг	10±2,5	4±0,6**	10±2,1	7±0,8**

Примечание. ГДА – горизонтальная двигательная активность, ВДА – вертикальная двигательная активность; * - достоверные отличия при $p<0,05$; ** - при $p<0,01$

Исследование выявило существенные различия в показателях ГДА между группами. Изменения ГДА проявлялась в разнообразных поведенческих паттернах - от целенаправленного перемещения в центр арены до круговых движений. Такая динамика свидетельствует о снижении тревоги и повышении исследовательской активности у животных.

Внутрибрюшинное введение пептидных фракций 5-10 кДа вызвало увеличение общей двигательной активности на 60% относительно контрольной группы. В тоже время интраназальное применение показало менее выраженный, но статистически значимый прирост на 45%.

Особый интерес представляют различия в периферии арены. Внутрибрюшинное введение увеличило активность на 25%, тогда как интраназальное - на 13%. Данные подтверждают, что пептидные фракции трутневого расплода способствуют постепенной нормализации поведения - от

первоначальной осторожности к активному исследованию всей площади арены, включая «опасные» открытые пространства.

В вертикальной двигательной активности были зафиксированы два основных вида стоек:

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

Анализ выявил следующие закономерности: внутрибрюшинное введение привело к увеличению ВДА на 29%, а интраназальное – показало более выраженный эффект на 40 %. Это свидетельствует не только о повышении общей двигательной активности, но и желание исследования нового места.

Норковый рефлекс представляет собой важный этап в исследовательской активности грызунов. Это позволяет животным анализировать окружающее пространство, выявлять источники пищи, а также реагировать на запахи.

Проведённая оценка норкового рефлекса продемонстрировала значимые изменения в поведении животных. Было зафиксировано увеличение актов обнюхивания: при длительном внутрибрюшинном введении показатель увеличился на 1,3%, а при интраназальном введении – на 65%.

Полученные данные позволяют утверждать, что введение пептидных фракций трутневого расплода способствует к уменьшению тревожно-фобических реакций у крыс. Это, в свою очередь, привело к усилению их интереса к окружающей среде и проявлению более активного исследовательского поведения.

Грумминг, включает комплекс гигиенических действий (чистка ушей, туловища и аногенитальной области), является главным показателем эмоционального состояния животных. Повышенная частота этого поведения часто ассоциируется с тревогой и стрессом, так как животные используют его как механизм самоуспокоения.

При внутрибрюшинном введении пептидных фракций данный показатель снизился на 50% по сравнению с контрольной группой, а при интраназальное введение - на 33%.

Это указывает на уменьшение уровня стресса и переход в привычную для них состояние. Значит, пептидные фракции трутневого расплода обладают анксиолитическим эффектом, что способствует нормализации поведенческих реакций.

Дефекационная активность рассматривается как маркер эмоционального состояния животных. В эксперименте подсчитывалось количество болюсов, выделенных животными за время нахождения в арене. Усиление актов дефекации показывает, что крысы испытывают стресс и тревогу. А снижение этого показателя свидетельствует об уменьшении эмоционального напряжения.

Анализ продемонстрировал снижение данного показателя под влиянием пептидных фракций трутневого расплода. При внутрибрюшинном введении наблюдалось уменьшение количества дефекационных актов на 43%, а при интраназальном – на 75% относительно контрольной группы.

Полученные данные позволяют выявить, что применение пептидных фракций трутневого расплода способствовало нормализации психоэмоционального состояния животных, уменьшая воздействие стрессогенных факторов.

Фризинг представляет собой поведенческую реакцию, проявляющуюся в полном обездвиживании животного, часто в физиологически неудобной позе. Данное состояние рассматривается как проявление страха и высокой тревожности.

Анализ выявил статистически значимое уменьшение при внутрибрюшинном введение на 50%, и на 35% при интраназальном. Снижение частоты эпизодов замирания свидетельствует о нормализации эмоционального фона и повышении исследовательской активности.

Результаты исследований представлены на табл. 2.

Таким образом, по результатам испытаний в тесте «Открытое поле», можно сделать вывод, что пептидные фракции трутневого расплода обладают анксиолитическим эффектом. Интраназальное и внутрибрюшинное введение пептидов трутневого расплода в течение 21 дня уменьшило эмоциональное расстройство и увеличило горизонтальную, двигательную, исследовательскую активность. Полученные результаты имеют важное значение для разработки новых препаратов с использованием пептидов трутневого расплода для уменьшения тревоги.

3.3 Результаты оценки влияния пептидов трутневого расплода на поведение животных в тесте «Тёмная/светлая камера»

Для исследования стрессового состояния животных был применен поведенческий тест «Темно-светлая камера». Он позволяет оценить уровень тревоги и адаптационные способности крыс в условиях смены среды.

В тесте регистрировались такие поведенческие параметры, как:

- Переход в светлую зону
- Переход в темную зону
- Продолжительность нахождения в светлом участке
- Продолжительность выглядываний в светлый отсек,
- Продолжительность 1 выхода в освещенную часть.

Анализ латентного времени выхода из темного отсека в светлую, продемонстрировал статистически значимые изменения при введении пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа. При длительном внутрибрюшинном введении наблюдалось сокращение на 13%, а при интраназальном – на 10%.

Уменьшение данного показателя свидетельствует о снижении уровня тревоги у животных, что проявляется в их способности быстрее адаптироваться к изменяющимся условиям среды.

Изменения также были зафиксированы и в количестве выходов в светлый отсек. Внутривбрюшинное введение пептидов трутневого расплода привело к увеличению данного показателя на 50%, а интраназальное – на 33%.

Данная динамика указывает, что увеличение числа переходов в освещенную зону может быть связано с улучшением эмоционального состояния животных. Это способствует более активному изучению окружающего пространства. Кроме того, данный эффект может отражать повышение любопытства и осмтрительности крыс, что характерно для особей с пониженным уровнем стресса.

При длительном внутривбрюшинном введении наблюдалось увеличение времени пребывания животных в освещенной зоне на 21%, а при интраназальном – на 17% по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3. Количественные показатели поведения животных в тесте «Тёмная/светлая камера»

Параметр, с	Группа животных			
	Контроль 1	Опыт 1	Контроль 2	Опыт 2
Переход в светлый отсек	180±11,1	135,16±7,5*	132,26±8,9	102,05±8,1*
Переход в темный отсек	180±0,5	270±7,15*	150±0,5	220±1,8*
Продолжительность нахождения в светлом участке	110±0,56	250±0,1**	130±0,66	200±0,9**
Выглядывания в светлый отсек	55±1,26	27,1±4,5*	50±3,66	20±3,4*
Продолжительность 1 выхода в освещенную часть	40±10,04	84±5,4*	44±11,1	110±1,8*

Примечание. * - достоверные отличия при $p<0,05$; ** - при $p<0,01$.

Увеличение продолжительности нахождения крыс в светлом отсеке может рассматриваться как показатель снижения тревоги и повышения

уровня комфорта. Животные начали чувствовать себя защищенными и проявляли большую уверенность в незнакомой среде.

Также снизился число выглядываний из темной камеры в светлую. Внутривбрюшинное введение пептидных фракций привело к уменьшению этого показателя на 50%, а интраназальное – на 33%. Уменьшение частоты выглядываний указывает на то, что крысы меньше испытывают потребности в оценке безопасности окружающей среды перед выходом в освещенную зону. Значит, пептидные фракции трутневого расплода способствуют снижению ощущения потенциальной угрозы, что подчеркивает их положительный эффект.

Пептиды трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа увеличили продолжительность выхода в освещенную часть камеры. При внутривбрюшинном введении наблюдалось увеличение данного показателя на 20%, а при интраназальном – на 28% по сравнению с контролем.

На основании проведенного теста «Тёмная-светлая камера» можно сказать, что пептидные фракции трутневого расплода проявляют выраженный анксиолитический эффект. Это подтверждается:

- Увеличением времени первичного исследования освещенной зоны;
- Снижением стрессовой реакции при переходе между отсеками;
- Формированием более адаптивного исследовательского поведения.

Результаты исследований представлены на табл. 3.

Исходя из результатов теста "Темная/светлая камера" после внутривбрюшинного и интраназального введения пептидных фракций трутневого расплода с молекулярной массой 5-10 кДа, можно сделать вывод, что они обладают анксиолитическим эффектом. Результаты подтверждают их влияние на эмоциональное состояние и поведение крыс.

3.4 Определение активности пептидил-дипептидазы А в мозге и сыворотке крови

Пептиды трутневого расплода, обладающие высокой биологической активностью, рассматриваются как перспективные регуляторы ферментативных систем.

После завершения эксперимента, у крыс провели забор и разделение мозга на следующие структуры мозга: гипофиз, гипоталамус, стриатум, гиппокамп, амигдала, четверохолмие и продолговатый мозг.

Исследование активности пептидил-дипептидазы А проводили в гомогенатах этих структур, а также в надпочечниках и сыворотке крови, для определения влияния ввода пептидов трутневого расплода, выделенных из продуктов пчеловодства

Результаты измерения ферментативной активности ПДПА в различных отделах мозга и сыворотке крови крыс представлены в табл. 4. Выявлено, что пептиды личинок трутневого расплода статистически достоверно ($p < 0,05$) снижают активность данного фермента по сравнению с животными контрольной группы в следующих образцах:

- в гипофизе на 46%;
- в гипоталамусе на 37%;
- в стриатуме на 37%;
- в амигдале на 53%;
- в четверохолмии на 57%;
- в продолговатом мозге на 40%.

Наибольшее ингибирующее действие наблюдалось в четверохолмии и амигдале, что может свидетельствовать о значительном влиянии пептидов на регуляцию нейроэндокринных и эмоционально-аффективных процессов. Умеренное, но статистически значимое снижение активности ПДПА в гипоталамусе и стриатуме указывает на возможное участие пептидов трутневого расплода в модуляции дофаминергических и стресс-регулирующих систем.

Таблица 4. Значения активности ПДПА в нервной ткани, надпочечниках и сыворотке крови

Образец	Группа животных	
	Контроль	Пептиды трутневого расплода
Пептидил-дипептидаза А, нмоль/мин на 1 мг белка		
Гипофиз	14±1,5	8±1,1*
Гипоталамус	3,85±0,56	2,47±0,1*
Стриатум	11,54±1,07	6,72±0,45*
Гиппокамп	4,14±0,34	5,98±,56
Амигдала	4,8±0,33	2,5±0,17*
Четверохолмие	4,71±0,54	2,08±0,14*
Продолговатый мозг	1,82±0,19	1,07±0,1*
Сыворотка крови	0,39±0,05	0,33±0,06

* — $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Известно, что действие ПДПА разносторонне:

- Регулирует артериальное давление и водно-солевой баланс через ренин-ангиотензиновую систему в кровотоке и с внешней стороны ГЭБ;
- В нервной ткани фермент катализирует отщепление С-концевого дипептида от олигопептидов со свободным С-концом и аминокислотой в предпоследнем положении, отличной от пролина (фермент участвует в процессинге брадикинина, мет-энкефалин-Arg-Phe, ангиотензина II, регулируя работу симпатической нервной системы через образование ангиотензина II);
- В различных экспериментальных работах установлено, что под влиянием ангиотензина II у животных снижается эффективность ассоциативной памяти и способность к обучению [39].

Исследование динамики активности ПДПА в мозговых структурах крыс выявило следующие закономерности:

1. В гипофизе и гипоталамусе снижение активности ПДПА может приводить к изменению концентрации ангиотензина II, регулирующего стресс - ответ организма.
2. В стриатуме снижение активности ПДПА может приводить к понижению общего уровня стресса за счёт модуляции работы опиоидной и дофаминергических систем[31].
3. В базолатеральных ядрах амигдалы имеются ГАМКергические нейроны, содержащие холецистокинин, в центральных ядрах — содержащие энкефалины и динорфин. Эти пептиды — субстраты ПДПА. Поскольку амигдала регулирует стресс-реактивность и тревожность, снижение активности ПДПА может уменьшать возбудимость ГАМКергических нейронов, ослабляя восприимчивость к стрессу [52].
4. В четверохолмии экспрессируются рецепторы к ангиотензину II, которые при стимуляции подавляют способность нейронов активироваться в ответ на визуальные стимулы.

Снижение активности ПДПА в четверохолмии может быть связано с уменьшением степени его активации через снижение концентрации ангиотензина II. Таким образом, пониженный уровень активности ПДПА в четверохолмии направлен на снижение тревожности за счёт снижения бдительности.

5. Снижение активности ПДПА в продолговатом мозге также связано с анксиолитическим эффектом пептидов трутневого расплода. Эта зона интегрирует сигналы стресс-активирующих структур и экспрессирует рецепторы ангиотензина II, что подтверждает роль ПДПА в регуляции тревожного поведения.

Таким образом, снижение активности ПДПА в продолговатом мозге, вероятно, является результатом анксиолитического действия пептидов трутневого расплода.

Таблица 5. Значения активностей ПДПА при добавлении пептидов трутневого расплода *in vitro*

Фермент	Образец	
	Контроль	Пептиды трутневого расплода
Пептидил-дипептидаза А	Активность, нмоль/мин на 1 мг белка	
	12,1±0,6	11,35±1,14

Для оценки влияния действия пептидов трутневого расплода на ПДПА был проведен эксперимент *in vitro*. В гомогенат гипофиза крыс добавляли:

- В контрольную пробу — дистиллированную воду;
- В опытную пробу — эквивалентный объем раствора пептидов (табл. 5).

Результаты показали отсутствие статистически значимых изменений активности ПДПА под действием пептидов в условиях *in vitro*.

Таким образом, результаты исследования показывают, что введение трутневого расплода вызывает значительные сдвиги в активности ферментов, связанных с метаболизмом регуляторных пептидов. Эти изменения отражают перестройку нейрохимических процессов, которая на физиологическом уровне проявляется снижением тревоги у животных в условиях длительного стресса. Эксперимент подтвердил, что хроническое стрессовое воздействие нарушает работу большинства нейромедиаторных и пептидергических систем.

При этом установлено, что пептиды из трутневого расплода не взаимодействуют напрямую с ПДПА, что исключает их прямое влияние на активность данного фермента. Полученные данные позволяют предположить, что механизм анксиолитического действия этих соединений

связан с альтернативными путями биохимической регуляции, которые требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы:

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

4. Выявлено, что изменения данных показателей поведения в тестах «Открытое поле» и «Тёмная/светлая камера» свидетельствует о наличии анксиолитического эффекта данных пептидных фракций.
5. Под действием низкомолекулярных пептидов трутневого расплода изменяется активность пептидил-дипептидазы А в нервной ткани и гипофизе крыс. Активность пептидил-дипептидазы А снижается в гипофизе (на 46%), гипоталамусе (на 37%), стриатуме (на 37%), амигдале (на 53%), четверохолмии (на 57%) и продолговатом мозге (на 40%). Низкомолекулярные пептиды продуктов пчеловодства не оказывают влияния на активность фермента в сыворотке крови, надпочечниках и *in vitro*.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

23. Хавинсон В. Х., Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее // Клиническая медицина. 2020. №3.
24. Харкевич Д. А. Фармакология. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. С. 225–229.
25. Харкевич Д.А Основы фармакологии. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015, 720 с.
26. Шейдер Р. Психиатрия. Перевод с английского. М.: «Практика». 1998. 485с. [Shejder R. Psihiatriya. Perevod s anglijskogo. М.: «Praktika». 1998. 485p. (In Russ.)].
27. Юматов Е.А. Психофизиология эмоций и эмоционального напряжения студентов: Монография // Издательство ИТРК. 2017. С.199.
28. Bentall R. Spike in anxiety and depression following UK lockdown announcement, study reveals. Accessed May 20, 2020.
29. Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. European Journal of Pharmacology. 2003; 463(1-3):55-65. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01274-3 Clinical pharmacology of anxiolytics Michel Bourin 2018
30. Bourin, Michel. Clinical pharmacology of anxiolytics. Archives of Depression and Anxiety. 2018. Vol. 4.
31. Buuse van den, M. Angiotensin-converting enzyme (ACE) interacts with dopaminergic mechanisms in the brain to modulate prepulse inhibition in mice / M, van den Buuse, T. W. Zheng, L. L. Walker, D. A. Denton // Neuroscience Letters. 2005. Vol. 380, № 1–2. P. 6–11
32. Daviu N., Bruchas M.R., Moghaddam B., Sandi C., Beyeler A. Neurobiological links between stress and anxiety // Neurobiol Stress. 2019. V. 11. P.100191. doi: 10.1016/j.ynstr.2019.100191
33. Erdos E.G., Skidgel R.A. Angiotensin-I-converting enzyme // Lab. Invest. 1987 56, N 4 345-348 c
34. Gary Walsh. Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications. 2007.
35. Gottschalk M.G., Domschke K. Genetics of generalized anxiety disorder and related traits // Dialogues Clin Neurosci. 2017. Vol. 19, № 2. P. 159-168.

36. Honek J. Preclinical research in drug development. / J. Honek.// Communications Consulting & Medical Writing. 2017. Vol.26. № 4.pp.5-7.
37. Huang, W., Percie du Sert, N., Vollert, J., Rice, A.S.C. General Principles of Preclinical Study Design. In: Bernalov, A., Michel, M., Steckler, T. (eds) Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine. Handbook of Experimental Pharmacology.2019.Vol.257. pp.55-57.
38. ICH guideline S6 (R1). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011. p.22.
39. Kerr, D. S. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism / D. S. Kerr, L. R. M. Bevilacqua, J. S. Bonini, J. I. Rossato, C. A. Köhler, J. H. Medina, I. Izquierdo, M. Cammarota // Psychopharmacology. — 2004. — Vol. 179, № 3. — P. 529–535.
40. Kondoh, G. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization / G. Kondoh, H. Tojo, Y. Nakatani, N. Komazawa, C. Murata, K. Yamagata, Y. Maeda, T. Kinoshita, M. Okabe, R. Taguchi, J. Takeda // Nature Medicine. 2005. Vol. 11, № 2. P. 160–166
41. Liu S., Yang L., Zhang C., Xiang Y., Liu Z. [et al.]. Online mental health services in China during the COVID-19 outbreak. Lancet Psychiatry, 2020;7(4):17-18.
42. Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrought, A. G. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. Vol. 193, № 1. P. 265-275
43. Moitra M, Santomauro D, Collins PY, Vos T, Whiteford H, Saxena S, et al. The global gap in treatment coverage for major depressive disorder in 84 countries from 2000–2019: a systematic review and Bayesian meta-regression analysis. PLoS Med. 2022;19(2).

44. Moskowitz, D. The Central Role of Angiotensin I-Converting Enzyme in Vertebrate Pathophysiology / D. Moskowitz, F. Johnson // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2004. Vol. 4, № 13. P. 1431–1452
45. Neugebauer, V. Amygdala, neuropeptides, and chronic pain-related affective behaviors / V. Neugebauer, M. Mazzitelli, B. Cragg, G. Ji // Neuropharmacology. 2020. Vol. 170.
46. Prager E.M., Bergstrom H.C., Wynn G.H., Braga M.F. The basolateral amygdale gamma-aminobutyric acidergic system in health and disease // J. Neurosci. Res. 2016. Vol. 96, № 6. P. 548–567
47. Royce L. Johnson , M. Foster Olive . Preclinical Psychopharmacology. 2021. Vol. 238. P. 1417–1436.
48. Ryan, M. J. ACE, ACE Inhibitors, and Other JNK / M. J. Ryan, C. D. Sigmund // Circulation Research.—2004. Vol. 94, № 1. P. 1–3.
49. Salvador A., Suay F., González-Bono E., Serrano, M. A. Anticipatory cortisol, testosterone and psychological responses to judo competition in young men // Psychoneuroendocrinology. 2003. Vol. 28. P. 364–375.
50. Sharp B.M. Basolateral amygdale and stress-induced hyperexcitability affect motivated behavior and addiction // Transl. Psychiatry. 2017. V. 7, № 8. P. 1–13
51. Steinmetz, K.L., Spack, E.G. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. 2009. Vol. 9. № 1. pp. 1–4
52. Sturrock, E. D. Peptidyl-Dipeptidase A/Angiotensin I-Converting Enzyme / E. D. Sturrock, C. S. Anthony, S. M. Danilov // Handbook of Proteolytic Enzymes. Elsevier, 2013. P. 480–494.