

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования
«Пензенский государственный университет»

На правах рукописи

КЛЫЧЕНКОВ СЕРГЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ
ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА**

1.5.4 — Биохимия

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кручинина Анастасия Дмитриевна
кандидат биологических наук

Пенза — 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Компонентная характеристика пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода.....	10
1.2 Биологическая активность продуктов пчеловодства.....	16
1.2.1 Антибактериальная активность пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода.....	16
1.2.2 Способность пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода влиять на поведение.....	18
1.3 Нейробиологические основы развития тревожности.....	20
1.3.1 Роль нейромедиаторных систем в развитии тревожности.....	21
1.3.2 Роль пептидергической системы в развитии тревожности.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	57
3.1 Характеристика пептидного спектра продуктов пчеловодства с применением хроматографических методов и электрофореза.....	57
3.2 Оценка способности низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства влиять на жизнедеятельность микроорганизмов.....	64
3.3 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса.....	68
3.3.1 Формирование хронического стресса и оценка степени его сформированности.....	68
3.3.2 Результаты оценки влияния низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства на поведение экспериментальных животных.....	71
3.4 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на активность ферментов процессинга нейропептидов.....	81
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	87
4.1 Пептидный спектр продуктов пчеловодства.....	87
4.2 Способность низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства влиять на	

жизнедеятельность микроорганизмов.....	88
4.3 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на поведение крыс в условиях хронического стресса.....	90
4.4 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на активность карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A и уровень гормонов стресса.....	93
ВЫВОДЫ.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Установлено, что пептиды играют важнейшую роль в регуляции физиологических процессов. Пептидная регуляция сложна и находится в равновесии с работой других регуляторных систем. Большое разнообразие пептидов, которых известно более 800 [288], а также широкий спектр их физиологических эффектов позволили сформулировать теорию функционального континуума [1]. Кроме того, изменения в пептидергической регуляторной системе также сказываются и на работе систем классических нейромедиаторов и нейротрансмиттеров.

На характер работы пептидергической системы влияют как эндогенные, так и экзогенные биологически активные молекулы. Большое значение не только с точки зрения фундаментальной науки, но и для практического применения имеют исследования по изучению биологических эффектов экзогенных низкомолекулярных пептидов. Особенно актуальным является поиск пептидов с различной биологической активностью, содержащихся в продуктах природного происхождения, в том числе маточном молочке, трутневом расплоде и пчелином мёде. Известно, что они обладают разнообразной биологической активностью [12, 123, 145, 149, 205, 227], основы проявления которой изучены мало. Эффекты продуктов пчеловодства связывают с влиянием отдельных компонентов на биологические системы. Например, установлена связь между антиоксидантным эффектом пчелиного мёда и фенольными соединениями растительного происхождения в его составе [145]. Относительно недавно стало известно, что в составе маточного молочка и пчелиного мёда, так же как и в трутневом расплоде, содержатся биологически активные пептиды. Между тем, активность этих пептидов изучена недостаточно.

Среди прочих эффектов, пчелиный мёд, маточное молочко и трутневый расплод оказывают антибактериальное действие на различные культуры микроорганизмов [97, 322, 328]. Одной из причин антагонистической активности продуктов пчеловодства по отношению к микроорганизмам могут быть антимикробные пептиды, имеющиеся в их составе. Изучение антибактериального действия таких пептидов является особенно важной задачей в связи с ростом количества случаев

антибиотикорезистентности бактерий. Развитие устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам связывают с широким применением антибиотиков в сельском хозяйстве, их нерациональным использованием в медицинской практике [256], с пандемией COVID-19 [239]. Антимикробные пептиды активно исследуются по всему миру как возможная замена существующим антибиотикам.

Единичные сообщения также свидетельствуют о способности растворов трутневого расплода, маточного молочка и пчелиного мёда влиять на поведение экспериментальных животных [39, 67, 123, 313], однако данные фрагментарны, и исследования в данной области нуждаются в системном подходе. Возможно, причиной наблюдаемых изменений в поведении животных является способность пептидов, имеющих в составе продуктов пчеловодства, влиять на характер работы различных нейромедиаторных систем нервной ткани, в том числе пептидергической. За последние десять лет в подтверждение данной гипотезы было найдено, что под действием интраназального введения пептидов продуктов пчеловодства изменяется также и активность разнообразных ферментов нервной ткани крыс [8, 25, 34, 35]. Ферменты обмена регуляторных нейропептидов (карбоксипептидаза E, пептидил-дипептидаза A и др.) участвуют в процессинге множества нейроактивных пептидов, регулируя их уровень на стадии созревания ограниченным протеолизом, поэтому изменение в уровне активности данных ферментов отражает функциональную нагрузку на пептидергическую систему различных регионов мозга [1].

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

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

Степень разработанности темы исследования. Биологические эффекты продуктов пчеловодства изучены недостаточно. Известно об антибактериальных, антиоксидантных, противовоспалительных, противораковых и других свойствах продуктов пчеловодства, которые связаны с компонентами растительного или пчелиного происхождения в их составе. Имеются сведения о ноотропном, анксиолитическом (противотревожном) и антидепрессивном эффектах пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода [33, 35, 68, 67, 295, 313]. Они могут быть связаны с биологической активностью пептидов, обнаруженных в составе пчелопродуктов. Недостаточная степень изученности низкомолекулярных пептидов из пчелиного мёда, маточного и трутневого расплода не позволяет достоверно судить о механизмах проявления того или иного эффекта.

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

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

1. Изучить пептидный спектр продуктов пчеловодства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле.
2. Разработать способ выделения и очистки пептидов массой до 5 кДа из продуктов пчеловодства.
3. Изучить способность выделенных пептидов влиять на поведение самцов крыс линии Wistar в условиях хронического стресса при постоянном интраназальном введении в концентрации 100 мкг/кг и 300 мкг/кг массы тела с применением ряда физиолого-фармакологических тестов.

4. Изучить способность выделенных пептидов влиять на концентрацию гормонов стресса (АКТГ и кортикостерона) в сыворотке крови и активность ферментов обмена нейропептидов (карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A) в нервной ткани, сыворотке крови и надпочечниках экспериментальных животных в условиях хронического стресса.
5. Изучить способность выделенных пептидов влиять на жизнедеятельность микроорганизмов, определив антибактериальную активность диско-диффузионным методом, их минимальную ингибирующую концентрацию и способность изменять общую дегидрогеназную и каталазную активность.

Научная новизна и практическая значимость данной работы состоит в том, что был разработан гибкий, масштабируемый и автоматизируемый способ выделения низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства. Впервые качественно охарактеризован спектр низкомолекулярных пептидов маточного молочка, пчелиного мёда и трутневого расплода. Впервые показана способность пептидов с массой до 5 кДа, выделенных из маточного молочка и трутневого расплода, влиять на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса, снижая уровень тревожности. Впервые показана способность низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства влиять на активность карбоксипептидазы E (КФ 3.4.17.10) и пептидил-дипептидазы A (КФ 3.4.15.1) в различных отделах головного мозга крыс линии Wistar. Впервые показано, что низкомолекулярные пептиды маточного молочка и трутневого расплода влияют на общую дегидрогеназную и каталазную активность *E. coli* и *S. aureus*. Установлено, что антибактериальный эффект продуктов пчеловодства является совокупностью разных факторов. На основе полученных данных была составлена заявка для программы Фонда содействия инновациям «УМНИК», победившая в конкурсе (договор 18646ГУ/2023 от 01.09.2023 «Разработка биологически активной добавки из пептидов маточного молочка с анксиолитическим действием»).

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования послужили труды учёных в области биохимии микроорганизмов, нейрохимии, энзимологии и пептидомики. Полученные в ходе эксперимента результаты

для оценки достоверности были статистически обработаны с применением методов оценки нормальности распределения и методов параметрического и непараметрического анализа.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на всероссийских и международных научно-практических конференциях: XII Международной научно-практической конференции EurasiaScience (Москва, декабрь 2017), Всероссийской (национальной) научно-практической конференции, посвящённой 90-летию со дня рождения профессора Г. Б. Гальдина «Роль вузовской науки в решении проблем АПК» (Пенза, октябрь 2018), IX Международной научно-практической конференции «Мир в эпоху глобализации экономики и правовой сферы: роль биотехнологий и цифровых технологий» (Москва, сентябрь 2021), XVIII научно-практической межрегиональной конференции «Биомедицина и биомоделирование» (Московская область, май 2022), II Всероссийской научно-практической конференции «Беккеровские чтения» (Волгоград, ноябрь 2022), Научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 90-летию со дня рождения член-корреспондента РАМН, профессора А. В. Завьялова «От молекулы к системной организации физиологических функций» (Курск, апрель 2023). По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 4 статьи в журналах списка ВАК РФ. Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ «Аспиранты» (проект №20-34-90050 «Изучение анксиолитического, антидепрессивного и актопротекторного эффекта пептидных фракций пчелиного мёда, маточного молочка и их влияние на активность ферментов обмена регуляторных пептидов»).

Положения, выносимые на защиту:

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

дазы А в различных отделах головного мозга экспериментальных животных, но не попадают в системную циркуляцию.

3. Пептиды массой до 5 кДа, выделенные из продуктов пчеловодства, не оказывают антибактериального действия на культуры *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae*.
4. Пептиды массой до 5 кДа, выделенные из маточного молочка и трутневого расплода, влияют на общую дегидрогеназную и каталазную активность *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Структура и объём диссертации: диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение и список цитируемой литературы, который содержит 408 наименований на русском и английском языках. Работа изложена на 150 листах, иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Компонентная характеристика пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода

Пчелиный мёд относят к сырью животного происхождения, состав которого сильно различается в зависимости от ботанического происхождения, сезона и породы пчёл [44]. Всего в мёде содержится около 200 различных соединений, пропорции или наличие которых зависит от многих факторов [147], однако основные — углеводы, вода и белки — варьируют в относительно небольших пределах. В среднем в мёде 15-21% сухих веществ (по массе). Среди них около 95% составляют углеводы [375], около 75% из которых моносахариды (глюкоза и фруктоза в разных пропорциях с преобладанием второй [44] (за исключением рапсового и одуванчикового сортов мёда, где глюкозы может быть больше [146])). Четверть приходится на дисахариды (сахароза, мальтоза, тураноза, изомальтоза, мальтоза, трегалоза, нигероза, коджибиоза, гентиобиоза, мальтулоза, изомультулоза, ламинарибоза) и олигосахариды (мальтотриоза, мелитоза, эрлоза, паноза, рафиноза) [333]. В среднем 0,57% по сухому весу приходится на органические кислоты, обеспечивающие слабую кислую среду мёда [348], среди которых бутировая, лимонная, уксусная, муравьиная, фумаровая, галактуронозная, глиокисловая, 2-гидроксибутировая, α -гидроксиглутамовая, изолимонная, α -кетоглутаровая, молочная, яблочная, малоновая, метилмалоновая, 2-оксопентановая, пропионовая, пировиноградная, хинная, шикимовая, янтарная, винная, щавелевая, глюконозная, левулинозная [128, 265]. В небольшом количестве в мёде также содержатся витамины и минералы, среди которых В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₈, В₉ (не более 40 мкг/кг каждый), С (не более 275 мкг/кг), ионы железа, калия, магния, цинка, кальция, натрия, свободные бор, фосфор, кремний, содержание которых варьирует от 0,04% до 0,2%, однако большую часть из них составляют натрий и калий [333]. В пчелином мёде также найдено большое разнообразие фенольных соединений растительного происхождения: 3,4-дигидроксибензойная, гидроксибензойная, хлорогеновая, кофеиновая, ванилиновая, сиреневая, *p*-кумаровая, феруловая, 3-(3,4-диметоксифенил)-2-акриловая, протокатеховая, синапиновая, гидроксикоричная кислоты, 3-окси-ацетилпинобанксин,

кверцетин, геспертин, пинобанксин, нарингенин, галангин, лутеолин, камферол, изорамнетин, рутин, апигенин, пиноцембрин, хризин, фентиловый эфир кофейная кислоты [180, 333].

В изучении белково-пептидного состава мёда относительный прогресс был достигнут сравнительно недавно. До начала 2010-х годов считалось, что если на углеводный и фенольный состав в большей степени влияет только ботаническое происхождение и возраст мёда, то белковый состав больше зависит от породы пчёл [384]. Было известно, что в среднем в пчелином мёде содержится около 1% белковых веществ, имеющих как растительное происхождение, так и животное, половина из которых приходится на низкомолекулярные белки и пептиды. Но впоследствии среди белков были идентифицированы такие ферменты, как сахараза, α - и β -гликозидаза, каталаза, кислая фосфатаза, амилаза, глюкозооксидаза [326], карбоксипептидаза Q, эстераза, липаза, дегидрогеназа [143, 321]. Среди белков без ферментативной активности были найдены подобные dirigent-белкам растений [98], ряд гликопротеинов, обладающих антибактериальной активностью [99], апальбумин-1 [120], а также нанолипосомы, содержащие большое количество белков растительного происхождения (АТФаза, FAD-связанная оксидаза, аденозилгомоцистеиназа, шапероны, актин, S-аденозилметионинсинтаза, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, каллозосинтаза, UDP-арабинопироназомутаза, альдолаза и др. ферменты и регуляторные белки [125]). Среди пептидов найдены антимикробные пептиды дефензин-1 и джеллеин-3 [241].

За рамками кулинарного использования пчелиный мёд в основном применяется в народной медицине. Несмотря на экспериментальные доказательства антибактериального [205] и антиоксидантного [145] эффекта, медицинские продукты на основе мёда нашли ограниченное применение только в качестве патчей и повязок для ускорения заживления кожных повреждений [240]. Использование мёда в данном контексте основано на высокой концентрации углеводов и слабокислым рН, что уменьшает риски инфицирования повреждений и ускоряет заживление. Существующие исследования о наличии нейропротекторного [149], противовоспалительного и кардиопротекторного [226] действий, способности позитивно

влиять на гликемический ответ организма [83] находятся на стадиях экспериментов *in vitro* или *in vivo* и являются доказательствами наличия наблюдаемых эффектов. Лишь малая часть исследований связывают тот или иной терапевтический эффект с конкретными молекулярными механизмами, задействованными в их обеспечении. Большинство из них базируются на роли отдельных компонентов (например, на роли фенольных соединений в обеспечении антиоксидантного эффекта).

Маточное молочко — секрет мандибулярных и гипофарингеальных желёз рабочих пчёл густой консистенции. Является одним из важнейших факторов фенотипической дифференциации самок в улье. Используется для питания личинок всех типов особей только в течение первых 3 дней развития, после чего только личинки маток продолжают получать маточное молочко, в то время как личинки всех будущих типов рабочих пчёл переходят на питание смесью мёда и пыльцы [343]. Химический состав маточного молочка варьирует в зависимости от породы пчёл: 60-70% воды, 7,5-15% углеводов (90% фруктозы и глюкозы, 0,8-3,6% сахарозы, небольшое количество мальтозы, трегалозы, мелибиозы, рибозы, раффинозы и эрлозы; углеводный состав сильно зависит не только от породы пчёл, но также от сезонности и географического происхождения [236, 255]), 7-18% липидов (90% свободные жирные кислоты среди которых большинство стеариновой, вакценовой, линолевой, γ -линоленовой и множество других в малых концентрациях, короткие гидрокижирные и дикарбоксикислоты с преобладанием 10-гидроксидекановой, 10-гидрокси-2-деценной, себациновой [170, 230, 231]; церамид, фосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин), главным источником которых является пыльца растений [404]. В различных образцах маточного молочка найдены такие ферменты и белки, как глутатион-S-трансфераза, глюкозооксидаза, альфа-глюкозидаза, лизоцим-1-подобный белок, регукальцин-подобный белок, дефензин, предшественник аполипофорин-III-подобного белка, ингибитор химотрипсина, предшественник икарапин-подобного белка и ряд других. Более половины всего белкового состава маточного молочка приходится на главные белки маточного молочка — MRJP 1-9 (54-86%), с преобладанием MRJP1 [183, 162, 267, 392]. Концентрация MRJP может изменяться под действием внешних факторов

(например, гербицидов [150]). Кроме питательной функции, MRJP также обеспечивает и гелеобразную конститенцию маточного молочка, т. к. MRJP1 представляет собой длинные филаменты гликолипопротеинов, соединённые между собой в пространственную сеть [266]. Данные генетического анализа указывают, что MRJP как семейство белков произошли от yellow-белков насекомых, играющих роль не только в развитии кожных покровов, но и регуляции поведения [58]. Отмечается, что гены белков семейства *mrjp/yellow* не найдены за пределами класса Насекомых, однако подобная последовательность нуклеотидов присутствует в геноме устойчивой к радиации бактерии *Deinococcus radiodurans* [258]. В составе маточного молочка также найдены свободные аминокислоты с преобладанием пролина, фенилаланина, лизина, глутаминовой кислоты и тирозина [212].

В медицинских целях маточное молочко находит применение только как компонент ряда биологически активных добавок. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* как цельного маточного молочка, так и его компонентов (разные типы MRJP и 10-гидрокси-2-деценвая кислота) отмечается способность к коррекции метаболического синдрома, улучшению репродуктивных качеств животных, антибактериальное и противогрибковое, противоопухолевое, антиоксидантное, противовоспалительное, гепатопротекторное, нейропротекторное, ноотропное, иммуномодулирующее, противогипертоническое, антидотное действие [12, 13, 36, 50, 53, 91, 123, 227, 263, 376], а также способность регулировать клеточный цикл и процессы дифференциации эукариотических клеток [374]. Маточное молочко широко применяется в народной медицине как в чистом виде, так и в виде лиофилизата. Оно зачастую входит в состав комбинированных биодобавок как вместе с другими продуктами пчеловодства, так и без них. Например, БАД Апифитотонус представляет собой комбинацию из 2% маточного молочка, 20% пыльцы и 78% пчелиного мёда и обладает актопротекторной активностью [14]. Другая патентованная добавка состоит из комбинации маточного молочка и плодов или цветков боярышника и имеет способность к уменьшению проявления симптомов сердечно-сосудистых заболеваний [38].

Трутневый расплод представляет собой личинки трутней, собранные на

разных сроках развития. Практическое применение в народной медицине нашёл гомогенат трутневого расплода (трутневое молочко), который представляет собой гомогенную смесь измельчённых личинок. Данные о химическом составе трутневого гомогената не столь исчерпывающи в силу низкой известности гомогената как продукта пчеловодства, однако найдено, что по составу он сходен с маточным молочком. В среднем в трутневом расплоде содержится 71% воды, 10% белков, 7% углеводов [328, 346], 5,5% жирных кислот [27] (по массе «сырого» гомогената), среди которых 10-гидроксидекановая, 10-гидроксидеценная, пальмитиновая, олеиновая, стеариновая [42], пальмитолеиновая, пальмитиновая, олеиновая, миристиновая, арахиновая, и ряд органических соединений, таких как бензойная кислота, паравинилгваякол, ванилин, трикозен, трикозан, пентакозен, пентакозан, гептакозен, гептакозан, нонакозен, нонаказан, гентриаконтен, гентриаконтан, тритриаконтен, тритриаконтан, п-винилгваякол, 25-гидрокси-24-метилхолестерол, ситостерин, фукостерин [15]. Среди белковых соединений и свободных аминокислот в гомогенате найдены все протеиногенные аминокислоты [328], из непотеиногенных найдены норвалин, оксопролин, гидроксипролин; органические кислоты: молочная, янтарная, яблочная, 3-гидроксипропионовая, 3-гидроксипентановая, фумаровая, 3,4-дигидроксипентановая, декановая, 2-гидрокси-2-метилбутандиовая, 2,3,4-тригидроксипентановая, додекановая, гидроксиглутаровая, 3-гидроксиадипиновая, 3,4,5-тригидроксипентановая, 9-гексадеценная, гексадекановая, гептадекановая, октадеценная, октадекановая, бензойная, аминокаприловая, аминоктановая, аминокадипиновая [40]. В составе гомогената найдены витамины С, D, В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₇, В₉, В₁₂, D, E, макро- и микроэлементы, такие как натрий, калий, кальций, магний, железо, магний, медь, селен, фосфор, сера, марганец, цинк, хром, бром, стронций [40, 88, 178, 346]. Состав гомогената также зависит от его формы и возраста личинок, использованных для производства. Например, лиофилизированный гомогенат содержит большее количество белка (больше 50% по массе), около 20% липидов и примерно 17% углеводов [328], количество деценовых кислот и сухих веществ растёт с возрастом личинки [5], а показатели окисляемости снижаются [31]. Большое значение для медицинского применения гомогената

ната имеет содержание гормонов: тестостерона, прогестерона, пролактина, эстрадиола [322], фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов [32].

Белково-пептидный состав трутневого расплода изучен бедно и больше со стороны динамических изменений, происходящих в процессе развития личинки. Методом ВЭЖХ/МС установлено присутствие 2840 различных белков и пептидов (1423 фосфорилированных [254]), из которых 309 (39%) были обнаружены только в образцах тканей, а 103 (13%) были найдены только в гемолимфе. Присутствие 522 белков определялось на протяжении всего срока личиночного развития, а изменения в их концентрации были разные для гемолимфы и тканей: содержание половины тканевых белков к пятым суткам развития снижалось, а содержание другой половины повышалось. Для гемолимфы изменения были более выражены. Отмечается, что такие изменения нельзя считать отражением изменения активности генов, т. к. на стадии личиночного развития пчелы увеличением свою массу за несколько дней более чем в тысячу раз, и изменения в относительных концентрациях белков могут быть связаны с сильным повышением содержания гексамерина [121, 151]. Наибольшее разнообразие белков наблюдается на вторые сутки развития [243], равно как и максимум активности трипсина и пептидных молекул [9]. Данные по содержанию определённых белков или пептидов в гомогенате как в лекарственном средстве или в зависимости от его лекарственной формы отсутствуют. Известно лишь, что лиофилизат сохраняет АТФазную и фосфатазную активность [84].

В исследованиях *in vivo* сообщается о снижении под действием трутневого гомогената уровня холестерина и триглицеридов [372], гепатопротекторном, иммуностимулирующем [345], антиоксидантном [344] и актопротекторном [29, 46] действиях, андрогенном [334] и гестагенном [335] эффектах, улучшении гормонального статуса [11]. На основе трутневого расплода разработан ряд биологически активных добавок, о влиянии которых на сердечно-сосудистую и половую системы человека сообщается в ряде публикаций [10, 30].

1.2 Биологическая активность продуктов пчеловодства

1.2.1 Антибактериальная активность пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода

Способность пчелиного мёда оказывать ингибирующее действие на жизнедеятельность микроорганизмов изучается давно и является одной из наиболее хорошо изученных типов биологической активности. Во множестве исследований *in vitro* мёд проявляет ингибирующую активность против таких грамположительных и грамотрицательных патогенов, как *Proteus spp.*, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori*, *Alternaria alternata* и *Trichoderma harzianum* [259, 395], многие штаммы которых развили антибиотикоустойчивость. Антибактериальная активность водных или забуференных растворов разных типов мёда варьирует в широких пределах: минимальная ингибирующая активность эвкрифийного мёда составляет 3,1% против MRSA [338], полифлорного мёда с горного массива Нилгири (Индия) 40% против *E. coli* [317].

Антибактериальная активность пчелиного мёда связывается с содержанием в его составе фенольных соединений, пероксида водорода, метилглиоксаля, белков, имеющих антибактериальную активность, а также с такими физико-химическими свойствами, как слабокислый pH, повышенное осмотическое давление из-за высокой концентрации углеводов и коллоидной природы мёда [100, 99, 97, 174]. Однако наиболее часто используемыми для изучения антибактериальной активности стали сорта мёда, имеющие высокую концентрацию метилглиоксаля (мёд мануки [360]) или пероксида водорода [396].

Несмотря на достоверно доказанное наличие антибактериального эффекта, пчелиный мёд к сегодняшнему дню нашёл ограниченное применение в клинической практике. Главная причина — отсутствие эффективных алгоритмов стандартизации, вызванной переменностью состава. Практически единственным клиническим применением пчелиного мёда является его использование в качестве местного средства для лечения нарушений целостности кожи различной этиоло-

гии и степени развития в виде накладок и повязок. Также изучается эффективность применения пчелиного мёда в комбинации с местными антисептиками и характер взаимодействия с ними [173]. Проводится сравнение в эффективности мёда и ранозаживляющих повязок на основе иод-повидона [399] (мёд демонстрирует большую эффективность). Разрабатываются новые комбинации мёда и других компонентов для усиления лечебного эффекта (например, пектиновый гидрогель [171] или мембраны [367], гидрогель на основе полисахаридов алоэ, поливинилового спирта и мёда [402] или крем, который при местном нанесении генерирует АФК [291]).

Большое значение для клинического использования мёда в качестве антибактериального агента имеют данные о зависимости эффекта от способа его подготовки перед производством лекарственных средств и изделий. Установлено, что на антибактериальную активность мёда мало влияет его степень кристаллизации, а при последующем нагреве такая активность даже незначительно увеличивается [102]. Существуют также данные о синергичности антибактериального действия мёда и крахмала, вытяжки базилика или витамина С [94, 225, 257].

Антибактериальная активность маточного молочка определяется только химическим составом и не зависит от его физико-химических свойств [296], но изучена в меньшей степени, чем пчелиного мёда. Среди компонентов маточного молочка антибактериальная активность найдена у 10-гидрокси-2-деценовой кислоты [388] и ряда белков и пептидов, таких как MRJP1-5, MRJP9, дефензин-1, гименоптаецин, аполипофорин, ферритин, джеллеин 1-3, апальбумин-2 [81, 143, 154, 157] в отношении *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus alactolyticus*, *Staphylococcus intermedius B*, *Staphylococcus xylosus*, *Salmonella choleraesuis*, *Vibro parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Cutibacterium acnes*, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Paenibacillus larvae* и др. [70, 332, 371]. Такое разнообразие антибактериальных белков и пептидов связано, как предполагается, с функцией маточного молочка как компонента коллективного иммунитета. Во-первых, маточное молочко является не только питательной средой для развития личинки, но и защитным фактором. Во-вторых, маточное молочко является способом обеспечения трансге-

нерационного иммунного прайминга [189] через вителлогенин при синтезе и секреции маточного молочка пчёлами-кормилицами.

В отличие от пчелиного мёда, использования в качестве антибактериального лекарственного средства маточное молочко не нашло вовсе. Несмотря на сообщения об антибактериальной активности, разработки препаратов на основе маточного молочка находятся только на начальной стадии. Более того, исследования в этой области сконцентрированы больше на применении отдельных компонентов, нежели цельного продукта [211, 337, 405]. Сообщается о разработке инкапсулированной формы маточного молочка, обеспечивающей большую стабильность его компонентов и контролируемый их выход для более стабильного терапевтического эффекта [352], об усилении антибактериального эффекта при комбинации маточного молочка с мёдом [92] или крахмалом [93].

В отношении антибактериальной активности гомогенат трутневого расплода не изучен вовсе. Известно, что пчёлы, как и все организмы, используют антимикробные пептиды в качестве компонента врождённого иммунитета: гименоптаецин, абаецин и апидаецин [111, 112, 113]. Однако значительная их концентрация наблюдается только в экспериментах по намеренному заражению личинок трутней патогенами [166], в то время как гомогенат, полученный от здоровых личинок, имеет низкую концентрацию AMP, недостаточную для проявления антибактериального эффекта [204].

В отечественной научной литературе можно встретить упоминание ряда препаратов, произведённых из трутневого гомогената, обладающих, в том числе, и антибактериальной активностью [41]. Однако все они не зарегистрированы как лекарственные средства, что не позволяет сделать вывод о соответствии проведённых клинических испытаний принципам доказательной медицины.

1.2.2 Способность пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода влиять на поведение

В отечественной и зарубежной научной литературе существует ограниченное количество исследований на тему способности продуктов пчеловодства

влиять на поведение, при этом практически все они сконцентрированы на анксиолитической, антидепрессивной и ноотропной активности пчелиного мёда и маточного молочка. В ряде публикаций указывается на способность мёда улучшать память крыс, подвергнутых воздействию стресса, оказывать антидепрессивное и анксиолитическое действие при различных способах моделирования депрессивного состояния и в сравнении с разными источниками углеводов [52, 68, 67, 127, 316]. Предполагается, что данное действие связано с антиоксидантной и антибактериальной активностью мёда, а также содержанием фенольных соединений [295]. Растворы мёда различной концентрации, вводимые перорально, оказывают антибактериальное действие в кишечнике и модулируют ось мозг-кишечник, что ведёт к изменению поведения у животных, интерпретируемое как антидепрессивное действие [394]. Дополнительное анксиолитическое действие могут оказывать содержащиеся в составе пчелиного мёда фенольные соединения, такие как хризин и пиноцембрин, которые демонстрируют способность уменьшать депрессивное поведение животных [156, 377].

Антидепрессивный, анксиолитический и ноотропный эффекты установлены также и для маточного молочка [65, 140, 313]. Кроме влияния на поведение в классических поведенческих тестах, маточное молочко повышает экспрессию сиртуина 1 в амигдале, снижает повышенную экспрессию генов синтеза и транспорта холестерина, тем самым влияя на повышенный при депрессии стероидогенез, снижает концентрацию ГАМК в гипоталамусе и стриатуме, кортикостерона в плазме крови, повышает концентрацию BDNF в гиппокампе и префронтальной коре [168, 200, 290, 312]. К сожалению, детальные данные о механизме действия компонентов маточного молочка в научной литературе отсутствуют, однако известно, что 10-гидрокси-2-деценная кислота также оказывает антидепрессивное и анксиолитическое действие [206, 379].

Сообщения о влиянии трутневого расплода на поведение единичны [33, 35, 39]. Детальных данных об основах наблюдаемого эффекта нет, однако установлено, что пептидная фракция влияет на активность карбоксипептидазы E и глицил-глицин-дипептидазы в нервной ткани [8, 34].

1.3 Нейробиологические основы развития тревожности

Под тревожностью понимают как нормальную физиологическую реакцию подготовки организма к опасности, так и патологическое состояние повышенного уровнем возбудимости ЦНС. Тревожность как патология является одним из самых распространённых нарушений психической деятельности, особенно после пандемии COVID-19. По данным метаобзора 2020 года, симптомы тревожности наблюдались у четверти пациентов [327]. В соответствии с МКБ-11 тревога определяется как реакция, направленная на будущую, предполагаемую угрозу, и в связи с этим выделяют следующие патологии, в которых тревожность является главным или сопутствующим симптомом:

- *Тревожные или связанные со страхом расстройства*: генерализованное тревожное расстройство (6B00), паническое расстройство (6B01), агорафобия (6B02), специфическая фобия (6B03), социальное тревожное расстройство (6B04), сепарационное тревожное расстройство (6B05) и селективный мутизм (6B06), вторичный тревожный синдром (6E63).
- *Тревожные расстройства вследствие употребления ПАВ*: тревожные расстройства из-за употребления алкоголя, каннабиса, синтетических каннабиноидов, опиоидов, седативных, снотворных или анксиолитических средств, кокаина, стимуляторов, в том числе амфетаминов, метамфетамина или меткатинона, синтетических катинонов, кофеина, галлюциногенов, летучих ингалятов, МДМА или сходных наркотических веществ, диссоциативных наркотических веществ и других уточнённых или не уточнённых ПАВ (6C40.71-6C47.71, 6C48.40, 6C49.61, 6C4B.71, 6C4C.71, 6C4D.71, 6C4D.61, 6C4E.71, 6C4G.71).
- *Расстройства цикла сон-бодрствование*: ночные кошмары, включая расстройства с тревожными сновидениями (7B01.2) [199].

Такой широкий спектр заболеваний, связанных с тревожностью, может свидетельствовать о комплексном характере данного типа психической активности. Современные научные данные подтверждают это, т. к. при тревожности изменяется функционирование не какого-то отдельного региона ЦНС, но меняется характер

работы разных отделов головного мозга как функционально, так и биохимически [37].

1.3.1 Роль нейромедиаторных систем в развитии тревожности

Холинергическая система. Рецепторы к ацетилхолину широко представлены в разных отделах нервной системы, связывание с которыми в большинстве случаев приводит к активирующему действию на нейроны. Работа холинергической системы необходима для нормальной способности удерживать внимание, учиться и запоминать новое, регуляции движения [3]. Однако также была показана её роль в модуляции работы системы подкрепления через мускариновые и никотиновые рецепторы. Так, холинергические клетки моста проецируются в богатые дофаминовыми нейронами вентральную зону покрышки и чёрное вещество, где модулируют активность дофаминергических нейронов. Богатая дофаминовыми нейронами терминальная часть прилежащего ядра содержат небольшое количество активных холинергических нейронов, плотно связанных с большинством нейронов этого компонента системы подкрепления [261].

Исследования демонстрируют важную роль холинергических рецепторов в развитии тревожности. На это указывает повышенный уровень ацетилхолина в нервной ткани у больных с депрессивными и тревожными эпизодами, а также чрезмерная возбудимость в ответ на стрессовые стимулы, наблюдаемая при нарушении механизмов инактивации ацетилхолина [185]. Существует также функциональная связь между вниманием и уровнем тревожности, опосредованная ацетилхолином. В норме уровень ацетилхолина в гиппокампе изменяется при обучении и обработке информации и консолидации воспоминаний. При фокусировании внимания на опасности в условиях хронической тревоги концентрация ацетилхолина повышается для поддержания достаточного уровня внимания к будущей угрозе [272]. Также показано, что вентральная часть гиппокампа имеет высокую плотность мускариновых рецепторов. При стрессе увеличивается как секреция ацетилхолина, так и активность нейронов в этом отделе гиппокампа, что ведёт к повышению уровня тревожности. При введении антагониста мускариновых рецепторов

активность нейронов снижается, что приводит к уменьшению выраженности тревоги [269].

Вклад в регуляцию тревожного поведения вносят также и никотиновые рецепторы, расположенные на дофаминовых нейронах вентральной зоны покрышки. При внутривенном введении никотина в количестве, аналогичном нормальной дозе курящего, активировались две популяции таких нейронов, имеющих разные функциональные проявления: нейроны, проецируемые в прилежащее ядро, и нейроны, проецируемые в ядра амигдалы. Ингибирование активности последних носит анксиогенный характер, в то время как активация уменьшает выраженность тревоги [289]. В целом никотиновые рецепторы задействованы в регуляции форм поведения, связанными со страхом и тревожностью [305]. Значение никотиновых рецепторов в развитии тревожности показано также и статистически: количество случаев тревожных расстройств практически в два раза выше среди курящих пациентов [238]. Таким образом, современные достижения в области изучения функционирования холинергической системы показывают её значение в патогенезе тревожных заболеваний [382].

Катехоламиновая система. К катехоламинам относят дофамин, норадреналин и адреналин. Нейромедиаторную функцию выполняют только первые два, тогда как адреналин секретируется мозговым веществом надпочечников и играет роль гормона [192].

Рядом исследований показано, что дофамин играет ключевую роль в регуляции страха и тревожности. Он не только модулирует работу стоп-механизма префронтальной коры в отношении анксиогенного направления амигдалы, но и влияет на характер передачи импульсов между её базолатеральными и центральными ядрами. Показано также, что дофамин из вентральной области покрышки активирует ряд регионов амигдалы (переднебоковые главные, паракапсулярные вставочные островки и боковые центральные ядра), связываясь с рецепторами обоих типов [278]. Анксиолитическая способность присутствует только у DRD1, т. к. при интраамигдальном введении антагонистов выраженность тревожности снижается, в то время как введение агонистов приводит к анксиогенному эффекту [106]. Дан-

ные о функции DRD2 при тревожности разнятся. Например, активация DRD2 в базолатеральных ядрах при интраамигдальном введении агонистов приводит к повышению тревожности, которая снижается при действии антагонистов [386]. У крыс с «тревожным» генотипом, связанным с полиморфизмом *Ncol*, концентрация дофамина в амигдале была снижена по сравнению со «спокойными» крысами, как предполагается, за счёт интенсивного метаболизма этого медиатора [28]. Однако в целом данные об общей концентрации дофамина в амигдале и тревожности свидетельствуют о корреляции высокого уровня его секреции в амигдале и передней части поясной коры с высоким уровнем тревожности. В то же время низкий уровень тревожности связан с низкой связностью этих двух регионов и пониженной концентрацией дофамина в амигдале [79]. Это также подтверждается и со стороны активности переносчика дофамина. При блокировании мРНК этого белка методом РНК-интерференции в прилежащем ядре у экспериментальных животных снижался общий уровень тревожности [72]. Также по-разному дофаминергическая система откликается на стресс в зависимости от возраста организма. Стресс в малом возрасте приводит к повышенной секреции дофамина в прилежащем ядре и выраженной тревожности, тогда как в зрелом возрасте воздействие такого же стрессового фактора не приводит к подобным изменениям баланса дофамина [391].

Роль норадреналина в развитии тревожности изучена слабо. Большинство исследований о значении этого нейромедиатора в патогенезе аффективных расстройств сконцентрированы на депрессивных синдромах, в том числе имеющих коморбидность с тревожными расстройствами [129]. В норме норадреналин вовлечён в процессы регуляции внимания, познания и обучения новому, регулирует сон и ответ организма на стресс [159]. Установлено, что норадреналинергические нейроны концентрируются в голубом пятне и проецируются в кору, лимбическую систему, ствол, промежуточный и спинной мозг, т. е. в отделы ЦНС, вовлечённые в регуляцию поведения, характер работы которых изменяется при развитии многих психиатрических заболеваний [101]. Через норадреналин также осуществляется контроль секреции кортиколиберина: норадреналинергические ядра посылают сигналы через вентральные норадреналинергические пучки

(VNAB), которые активируют кортиколибериновые нейроны в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса [207]. Экспериментально показано, что разнообразные стрессовые события, включая эмоциональный стресс, значительно повышают секрецию норадреналина в гипоталамусе, амигдале и голубом пятне. Дополнительно антагонисты $\alpha 2$ -адренорецепторов оказывают анксиогенный эффект за счёт накопления норадреналина в тех же регионах мозга [96, 362], что позволило сформулировать теорию о центральной гиперсекреции норадреналина как одного из главных факторов в патогенезе генерализованного тревожного расстройства [218].

Серотонинергическая система. Другим моноамином, играющим роль в регуляции и патогенезе тревожности, является серотонин. Серотонинергические нейроны локализуются в ядрах шва и проецируются в вентромедиальную префронтальную кору, амигдалу, гиппокамп и базальные ганглии, а зоны проекции сходны с проекциями норадреналинергических нейронов [3]. Предполагается, что через серотонинергическую систему происходит центральная регуляция тревожного поведения, однако детальные механизмы этой регуляции неизвестны. Экспериментальные данные по изучению серотониновых нейронов, рецепторов серотонина и уровня его секреции в норме и при патологии противоречивы. Точно известно, что при ПТСР, ОКР и панических расстройствах характер работы серотонинергической системы изменяется. Однако из-за широкого разнообразия рецепторов и сильно различающейся по спектру функциональной нагрузки отделов головного мозга, куда проецируются серотонинергические нейроны, характер изменения работы этой системы варьирует вплоть до диаметрально противоположных эффектов [155, 181, 182, 214]. Например, экспериментально показано, что повышенная секреция серотонина в базолатеральных и латеральных ядрах амигдалы ведёт к повышению уровня страха и тревожности [60]. Снижение же секреции серотонина под действием 5,7-дигидрокситриптамина обеспечивает анксиолитический эффект [351], в то время как низкий уровень серотонина в медиальной префронтальной коре и вентральном гиппокампе ведёт наоборот, к повышению тревожности [311, 370]. В то же время нокаутные мыши по гену триптофангидроксилазы 2 демонстрируют сниженный уровень тревожности в различных поведенче-

ских тестах [280]. Из достоверно известных нейробиологических механизмов, работающих при тревожных состояниях, изучены пока только три пути. Во-первых, для уменьшения тревожного поведения серотонин связывается с нейронами дорсальной части ядра ложа терминальной полоски через 1A рецепторы и гиперполяризует их [165]. Во-вторых, серотонин из серотонинергических нейронов ядер шва повышает уровень тревожности и страха, активируя субпопуляцию кортиколибериновых нейронов дорсальной части ядер ложа терминальной полоски. Серотониновые проекции из дорсальных ядер шва также через 2C рецепторы ингибируют анксиолитическую активность кортиколибериновых нейронов дорсальной части ядер ложа терминальной полоски на вентральную область покрышки и боковой гипоталамус [260]. В-третьих, было выяснено, что серотонин по-разному модулирует тревожность, вызванную различными стимулами. У мышей нейроны дорсальных ядер шва, секретирующие серотонин и экспрессирующие VGLUT3, проецируются в базальную часть амигдалы и область пирамидальных нейронов. Активация первых ингибирует секрецию серотонина через ГАМК_B-рецепторы на серотониновых терминалах в базальной части амигдалы, что вызывает тревожность по типу социального избегания, а также страх ярко освещённых мест. Однако активация нейронов второй группы — субпопуляции пирамидальных нейронов базальной части амигдалы — через серотониновые нейроны 1A и 1B типа, что приводит только к реакции социального избегания [393]. В-четвёртых, серотонинергические нейроны шва, проецируемые в амигдалу, вызывают тревожное поведение, а проецируемые в префронтальную кору — анксиолитический эффект [369].

Неоднозначность роли серотонина в развитии тревожности отражается также и в клиническом аспекте. Для лечения тревожных расстройств зачастую применяются ингибиторы обратного захвата серотонина, однако при разовом введении таких препаратов тревожность у больных наоборот, повышается, но такой эффект не наблюдается у людей без проявлений симптомов аффективных расстройств [284]. В то же время найдено, что у больных с паническими и социальным тревожным расстройствами наблюдается низкое сродство к 1A типу ре-

цепторов [56], однако в моделях *in vivo* агонисты этого же типа рецепторов проявляют своё действие только в ограниченном наборе моделей тревожного поведения [369]. Продемонстрирована также и связь с характером работы переносчика серотонина в таламусе. Например, у больных с униполярным большим депрессивным расстройством и ОКР снижено сродство переносчика 5-НТТ, что коррелирует с повышенным уровнем кортизола в сыворотке крови [319].

Для описания роли серотонина в развитии тревожности и тревожных расстройств был предложен целый ряд теорий. На сегодня наиболее популярной считается теория «серотониновых качелей». В соответствии с ней, тревожность характеризуется повышенной активностью серотонинергической системы, в то время как депрессия — пониженной. Однако примерно в трети случаев тревожность и депрессия — коморбидные состояния, а серотонин оказывает как анксиолитический, так и анксиогенный эффект в зависимости от отдела мозга и причин тревожности [57, 354]. Дополнительную сложность в создание комплексной и точной теории также вносит и разнообразие серотониновых рецепторов: в животных моделях только в случае активации пресинаптических 1А и 2В и блокировании пресинаптических 1В, 2А, 3 и 5А рецепторов проявлялся анксиолитический эффект, тогда как для постсинаптических 1А и 1В, 2С, 4, 6 и 7 типов аналогичный эффект наблюдался как при активации этих рецепторов, так и при их блокировании.

ГАМКергическая и глутаматергическая системы. Гамма-аминомасляная кислота — основной тормозной нейромедиатор головного мозга млекопитающих, обеспечивает регуляцию двигательной функции, формирование эмоционального поведения, организации процессов обучения и памяти, поддержания условных рефлексов, модулирует работу других нейромедиаторных систем [3]. Несмотря на долгую историю применения бензодиазепинов (аллостерических модификаторов ГАМК_A-рецепторов) в качестве транквилизаторов и седативных средств, до сих пор не существует чёткой модели, объясняющей роль ГАМК в формировании тревожного поведения в норме и при патологии. Противоречивые результаты различных экспериментальных работ не позволяют сделать однозначного вывода об

эффекте ГАМК как модулятора тревожности. Например, животные со сниженным уровнем синтеза ГАМК в ядрах ложа терминальной полоски демонстрируют меньшую подверженность стрессу и тревоге [325]. Повышенный уровень ГАМК в вентромедиальной префронтальной коре наблюдается при тревожности [135], в то время как внутримозговая гипофункция ГАМК_{Aδ}-рецепторов является причиной стрессогенной тревожности [314]. Активация ГАМК_A-рецепторов тормозит возбудимость прелимбической коры и приводит к анксиолитическому эффекту [175]. В целом, дисрегуляция работы ГАМКергической системы связана с развитием расстройств тревожного спектра, эпилепсии и бессонницы [275, 285]. Однако более подробная информация о роли ГАМКергической системы в формировании этих патологий неизвестна, равно как и неизученной остаётся роль секреции ГАМК глиальными клетками [340, 403].

В ряде публикаций изменения в работе ГАМКергической системы рассматриваются больше со стороны следствия, нежели причины тревожности [276]. Таким образом, отклонения в секреции или рецепции ГАМК как тормозного нейромедиатора являются компенсаторными механизмами, которые обеспечивают нейрохимические основы для адаптации к пребыванию индивида в высокострессовых ситуациях. Например, у мышей с повышенным уровнем тревожности в амигдале было увеличено содержание обеих форм глутаматдекарбоксилазы (GAD65 и GAD67), различных субъединиц ГАМК_A и ГАМК_B рецепторов (α 1-5, β 1-3, γ 1-2, GBBR1, GBBR2) и их мРНК, что рассматривается как попытка компенсации чрезмерной возбудимости амигдалы и других отделов мозга, участвующих в регуляции тревожного поведения [363]. Усиление данного адаптивного ответа организма лежит в основе проявления терапевтического эффекта тиагабина при генерализованном тревожном расстройстве [308].

Другая потенциальная роль ГАМКергической системы — осуществление патогенетической связи между тревожностью и депрессией. Установлено, что генетические полиморфизмы в генах ГАМК-рецепторов обоих типов ведут к развитию различных аффективных расстройств, в том числе тревожности [219]. Также при патологической тревожности в амигдале наблюдается дефицит не только

ГАМК, но и серотонина [51]. Экспериментально показано, что ГАМКергические нейроны подавляют активность серотонинергических нейронов в дорсальных ядрах шва, что приводит к снижению секреции серотонина в других отделах мозга и развитию депрессивных состояний [193]. Данная теория находит применение и в клинической практике: аллостерические модуляторы ГАМК_B-рецепторов — перспективные антидепрессанты и анксиолитики, а для лечения тревожных расстройств, наряду с бензодиазепинами, применяются также агонисты 5HT_{1A}-рецепторов и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина [134, 153].

Функционально в развитии и регуляции тревожности с работой ГАМКергической системы связана также и глутаматергическая. В целом глутаминовая кислота является главным возбуждающим медиатором, действующим во всех отделах ЦНС, а проекции глутаматергических нейронов находятся в коре больших полушарий, обонятельной луковице, гиппокампе, чёрном веществе, мозжечке, глутаматергические синапсы обнаружены в амигдале и стриатуме [3].

В научной литературе не существует единой теории о роли глутаматергической системы в развитии и поддержании тревожности, объединяющей разрозненные факты [61]. Несмотря на это предполагается, что в норме или у индивидов со сбалансированным фенотипом депрессия/тревожность существует баланс между торможением процессов возбудимости как результат работы ГАМКергической системы и активацией таковых под действием глутаматергической системы. В соответствии с этой теорией функционального равновесия временный сдвиг в сторону активации ведёт к реакциям тревожного типа и активации гиппокампа, прилежащего ядра и амигдалы. В то же время постоянный патологический сдвиг приводит к расстройствам тревожного спектра, тогда как постоянное доминирование тормозящей ГАМКергической системы приводит к расстройствам депрессивного спектра [217]. Однако противоречивые результаты по изучению уровня секреции глутамата и характеру активации глутаматных рецепторов подтверждают данную гипотезу лишь частично. Установлено, что у людей с тревожным расстройством повышен уровень глутамата в таламусе, передней поясной извилине и головном мозге в целом [273, 307], а антагонисты NMDAR и mGluR8 вызывают анксиолити-

ческий эффект [71, 397]. В других исследованиях наоборот, пренатально стрессированные крысы с высоким базовым уровнем тревожности имеют сниженный уровень секреции глутамата в вентральном гиппокампе, а делеция гена везикулярного переносчика глутамата 3 (VGLUT3) приводит к повышению тревожности у мышей [62, 262].

Несмотря на общую малую изученность вопроса о роли глутаматергической системы в развитии тревожных состояний, существуют теории, объясняющие патогенез отдельных заболеваний тревожного спектра или описывающие характер работы определённых нервных путей регуляции тревожного поведения. Например, существует путь для регуляции интенсивности проявления стрессогенной тревожности, нарушение работы которого влечёт к развитию тревожных патологий. Установлено, что активность базолатеральных ядер амигдалы также регулируется глутаматергическими проекциями из дорсомедиальной префронтальной коры. Повышенная секреция глутамата, вызванная психоэмоциональным стрессом, вызывает смену реципрокного характера взаимодействия этих двух регионов мозга на однонаправленный с преобладанием активирующих сигналов из префронтальной коры в амигдалу, что увеличивает активность последней, опосредуя повышенный уровень тревожности [249]. Также хорошо изученным является механизм возникновения и усиления симптомов при ПТСР под действием высоких концентраций глутамата. В соответствии с этой моделью при сильном стрессе и психологической травме происходит дизрегуляция ГГНО, что ведёт к повышенному уровню секреции глутамата. Как следствие, возникает ауторегуляция метаботропных mGluR2 и mGluR3 и снижению их чувствительности в попытке адаптации, что приводит к ещё большему повышению глутамата. В конечном итоге возникает эксайтотоксичность, которая приводит к снижению синаптической связности, что ведёт к ещё большей дизрегуляции путей контроля реакций страха и тревожности [64]. В подтверждение этой теории было продемонстрировано, что повышенный уровень глутамата ведёт к волюметрическим изменениям в лимбической системе и разных регионах коры за счёт ремоделинга дендритных сетей [282].

Также экспериментально показано, что глутаматергическая и серотонинергическая системы регулируют развитие тревожности общества. Например, при введении NMDA в дорсальную часть околосредового серого вещества уровень тревожности крыс увеличивался. Однако таких изменений не происходило, если животных предварительно подвергнуть воздействию антагонистов 5-HT_{1A}-рецепторов. В то же время при предварительном введении агонистов тех же рецепторов тревожность под действием NMDA развивалась [279].

Тем не менее, малая изученность роли глутаматергической системы в регуляции тревоги и тревожного поведения не является препятствием для разработки новых классов анксиолитических препаратов, таких как антагонисты и частичные агонисты NMDAR, агонисты AMPAR и аллостерические регуляторы mGluR разных типов [320, 380]. Возможная связь между глутаматергической и серотонинергической системами также обосновывает дискутируемое применение кетамина в качестве антидепрессанта и для лечения ПТСР [163].

Нейростероиды, газотрансмиттеры и эндоканнабиноиды. Нейростероиды представляют собой липофильные молекулы, построенные на основе конденсированной циклической системы ланостерола. Первоначально под нейростероидами подразумевались только молекулы, синтезируемые в нервной ткани ЦНС *de novo*. Однако теперь нейростероидами считают и молекулы, прекурсоры которых синтезированы за её пределами. К ним относятся такие стероиды, как аллопрегненолон, дегидроэпиандростерон и его сульфат, прогестерон, прегненолон, 3 α ,5 α -тетрагидропрогестерон и ряд других. По современным представлениям, нейростероиды синтезируются как нейронами, так и глиальными клетками. Клетки, где происходит нейростероидогенез, маркируют цитогистохимическими методами по наличию активности ферментов их синтеза (цитохром P450_{ssc} (20,22-десмолаза), 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназа, 5-альфа-редуктаза, цитохром P450_{c17} (17-альфа-гидроксилаза) [331].

За последние 15 лет заметно вырос интерес к биологическим функциям нейростероидов. Активно исследуются их роль в регуляции процессов нейрогенеза и ноцицепции, патогенезе воспалительных процессов в ЦНС, эпилепсии, шизофре-

нии, депрессии и других заболеваний нервной системы, включая тревожные расстройства [330]. В целом вопрос о влиянии нейростероидов на регуляцию тревожности остаётся мало изученным, но существует ряд исследований, в которых показано, что аллопрегнанолаон и дегидроэпиандростерон участвуют в регуляции ответа организма на стресс и оказывают анксиолитический эффект. Данное уменьшение тревожности реализуется через снижение функциональной связности между амигдалой и дорсомедиальной префронтальной корой, предклиньем и гиппокампом [163]. Показано также, что аллопрегнанолаон участвует в регуляции настроения у женщин в период менструального цикла. Низкие или средние концентрации увеличивают активность амигдалы, а высокие уменьшают [69]. У крыс с тревожностью, вызванной хронической нейропатической болью, увеличено содержание прегненолона, прогестерона, деоксикортикостерона и аллопрегнанолаона в гиппокампе [401].

В ряде исследований продемонстрирована роль нейростероидов в нормальном развитии нервной системы. Так, повышенный уровень аллопрегнанолаона в постнатальный период изменяет характер развития гиппокампа, что ведёт к снижению его же анксиолитического действия во взрослом возрасте [274]. Интронные SNP в гене альдокеторедуктазы 1-го семейства, влияющие на эффективность работы фермента, положительно коррелируют с количеством панических расстройств у женщин, оказывая влияние на доступность прогестерона или скорость его превращения в аллопрегнанолаон [315].

Наиболее хорошо изучено анксиолитическое действие нейростероидов, реализуемое за счёт аллостерической регуляции ГАМК_A-рецепторов. Модулирующая активность на эти рецепторы показана для прогестерона, прегненолона, 3 α ,5 α -тетрагидропрогестерона, дегидроэпиандростерона и его сульфата. Предполагается, что активирующее действие ГАМК_A-рецепторов под действием нейростероидов реализуется как фазически (за счёт активации синаптических γ 2-рецепторов), так и тонически (через связывание с δ -рецепторами), причём рецепторы второго типа более чувствительны к ним [110]. Найдено, что при генерализованном тревожном расстройстве уровень последнего снижен, а при ПТСР повышен, но только у муж-

чин [194, 250, 318]. Более того, показана способность нейростероидов регулировать работу также и NMDA- и каинатных рецепторов [148].

Вовлечённость нейростероидов в регуляцию тревожности делает их перспективными кандидатами для создания лекарственных препаратов для лечения аффективных расстройств. FDA одобрена лекарственная форма аллопрегнанолон (брексанолон) в качестве антидепрессанта, модулирующего работу ГАМКергической системы, а зуранолон (3 α -гидрокси-3 β -метил-21-(4-циано-1H-пиразол-1'-ил)-19-нор-5 β -прегнан-20-он) находится на стадии клинических испытаний [408].

К газотрансмиттерам относят оксид азота (II) NO, сероводород H₂S, монооксид углерода CO и оксид серы SO₂. Эти молекулы образуются эндогенно в нервной ткани из соединений-доноров, имеющих соответствующие функциональные группы.

Роль газотрансмиттеров в формировании тревожности в целом изучена мало, и наибольшее количество публикаций приходится на NO. Известно, что в норме нейрональный оксид азота (nNO) действует как в ЦНС, так и ПНС. nNO участвует в контроле осцилляторной активности нейронов, ноцицепции, циркадных ритмов, обоняния, термогенеза, пищевого и водного аппетита, а также в передаче межклеточных сигналов как вторичный мессенджер [3]. Предполагается, что nNO реализует свои физиологические эффекты за счёт модуляторного действия на классические нейромедиаторные системы (ГАМК, серотониновая и глутаминовая), активируя МАРК-путь и цГМФ-сигнальную систему, либо через связывание с соответствующими рецепторами [268, 301]. Результаты исследований в этой области противоречивы и указывают на противоположные эффекты, возникающие при активации nNO-системы. Например, при вызванной эуфиллином тревоге пероральный приём доноров оксида азота снижал выраженность стрессового поведения, а последующий приём ингибитора NO-синтазы — повышал [179, 277]. Однако в других исследованиях ингибиторы этого фермента вызывали анксиолитический эффект [248, 378]. В то же время введение NO-доноров в ядро ложа терминальной полоски и медиальную префронтальную кору приводило к повышению тревожности [132, 152]. Несмотря на это, достоверно показана связь между

nNO-системой и другими нейромедиаторами. Например, антагонисты кортиколибериновых и NMDA рецепторов снижают анксиогенное действие nNO. Активация постсинаптических NMDA и AMPA рецепторов приводит к стимуляции нейрональной синтазы оксида азота, а снижение активности nNO-системы приводит к снижению метаболизма моноаминов [108, 152, 406]. Установлен также один из возможных механизмов возникновения тревожности при хронической боли. Предполагается, что экспрессирующие NO-синтазу нейроны вентромедиальной префронтальной коры активируются проекциями нейронов передней части паравентрикулярных ядер таламуса, что ведёт к секреции оксида азота. Такой nNO увеличивает эффективность передачи сигнала через глутаматергическую систему в вентромедиальной префронтальной коре через активацию AMPA-рецепторов путём их нитрозилирования у нейронов, экспрессирующих Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую протеинкиназу 2 α [246].

Рядом исследований отмечается, что на современном уровне развития наук о мозге пока ещё невозможно однозначно сказать о роли NO в развитии тревожности, а эксперименты на эту тему имеют ряд методических изъянов. Большая часть таких исследований проведены с применением доноров оксида азота, которые сами по себе могут оказывать анксиолитический или анксиогенный эффект, либо с применением неспецифических ингибиторов NO-синтазы [306].

Роль сероводорода, монооксида углерода и оксида серы в регуляции тревожного поведения исследована крайне слабо. Показано, что ЦНС H_2S синтезируется из цистеина с участием цистатионин-бета-синтазы, цистатионин-гамма-лиазы и цистеин-аминотрансферазы, либо через превращение цистеина в 3-меркаптопируват и дальнейшее десульфирование под действием 3-меркаптопируват-серотрансферазы [49, 164, 184]. H_2S вовлечён в долговременную потенциацию и регуляцию ГАМК_B-рецепторов в гиппокампе, участвует в поддержании уровня внеклеточного кальция и pH. CO в ЦНС синтезируется гемоксигеназой 1 и 2 (первая изоформа экспрессируется во всех нейронах и глиальных клетках, вторая изоформа найдена в гиппокампе, гипоталамусе, неокортексе, обонятельных луковицах и мозжечке) и может быть вовлечён в модуляцию работы переносчиков дофамина и

глутамата через модуляцию цГМФ-сигнального пути [364, 373]. Источники оксида серы в нервной системе не найдены, а функции не установлены. В единичных исследованиях функции сероводорода получены противоречивые результаты. Например, в части экспериментов доноры сероводорода оказывали анксиолитический эффект, но не у всех видов экспериментальных животных [221, 301]. Достоверно была показана способность активации NMDA-рецепторов и стимуляции обратного захвата ГАМК [124].

Доля исследований роли CO и оксида серы в формировании тревожного поведения минимальна. Найдено лишь, что лизинат гема и димер трикарбонилдихлорорутения (II) — доноры CO — при введении в голубое пятно и внутрибрюшинно соответственно снижали тревожность [109, 119]. Доноры оксида серы — сульфат и гидросульфат натрия — оказывали анксиолитический эффект в модели хронического непредсказуемого стресса [220, 339].

Парадоксально мало изучена роль эндоканнабиноидной системы в регуляции тревожного поведения. Несмотря на длительную историю применения растительных источников каннабиноидов в рекреационных целях, заметное внимание исследователей к этой системе, участвующей в формировании поведения и настроения, начало появляться только в последнее десятилетие. Было найдено, что эндоканнабиноидная система регулирует процессы синаптической передачи сигнала и состоит из рецепторов двух типов (CB1R и CB2R), самих эндоканнабиноидов (анандамид, N-арахидонил-дофамин (NADA) и 2-арахидоноилглицерол (2-AG)) и ферментов их обмена: диацилглицероллипазы-альфа, моноацилглицероллипазы, гидролазы амидов жирных кислот [115]. Эндоканнабиноиды синтезируются как нейронами, так и глиальными клетками. 2-AG секретируется на постсинаптической мембране и связывается с CB1R на пресинаптической терминали, что ингибирует секрецию нейротрансмиттера, а CB2R участвуют в иммунных реакциях и найдены на микроглиальных клетках [390].

В немногих исследованиях по изучению детальных механизмов влияния эндоканнабиноидной системы на тревожность показано, что как снижение, так и увеличение её активности приводит к повышению тревожности. У нокаутных по

гену CB1R, с делецией в гене моноацилглицероллипазы или её сверхэкспрессии в глутаматергических нейронах гиппокампа мышей наблюдался повышенный уровень тревоги [177, 208, 342], а нокаут CB1R в ГАМКергических нейронах переднего мозга приводил к снижению тревожности [187].

В настоящее время предполагается, что эндоканнабиноидная система регулирует баланс между реактивностью и пассивностью в ответ на внешние и внутренние стимулы через регуляцию других нейромедиаторных систем [253]. Известно также, что эффект экзогенных каннабиноидов дозозависим (при низких дозах наступает анксиолитический эффект через модуляцию работы кортикальной глутаматергической системы, а при высоких происходит повышение тревожности через влияние на работу ГАМКергической системы переднего мозга [387]). На этом основании предполагается, что одно или иное воздействие на эндоканнабиноидную систему в различных отделах мозга приводит к противоположным эффектам за счёт изменения работы разных нейромедиаторных систем, чем и объясняется противоречивость экспериментальных данных. В целом сегодня считается, что эндоканнабиноидная система перспективна как объект для изучения с целью разработки новых анксиолитических препаратов и антидепрессантов [195].

1.3.2 Роль пептидергической системы в развитии тревожности

Другим типом нейрорегуляторов являются нейропептиды. Известно, что они широко вовлечены практически во все процессы передачи сигнала не только в ЦНС, но и за её пределами. Нейропептиды передают сигналы не только паракринно, аутокринно и юкстакринно, но и действуют как гормоны. На сегодня открыто более 800 различных нейропептидов [288]. Большое разнообразие как самих пептидов, так их функций и биологических эффектов, позволило сформировать теорию функционального пептидного континуума. В соответствии с ней каждый из пептидов, обладая уникальным комплексом активностей, функционально близок или совпадает с другими пептидами по физиологическому действию, что складывается в непрерывный спектр с плавным переходом от одного комплекса функций к другому. Кроме нейропептидов, в регуляции работы различных пептидергиче-

ских систем также участвуют и ферменты их процессинга, обеспечивающие их созревание и модификацию функциональной активности через ограниченный протеолиз и сортинг [1].

Большое разнообразие пептидов и оказываемых ими эффектов значительно затрудняет изучение их вклада в регуляции тревожности, поэтому на сегодня известно относительно детально лишь о механизме работы ГГНО и её роли в активации тревожности в норме.

ГГНО берёт своё начало в гипоталамусе и регулируется через либерины и статины. Работа ГГНО также характеризуется поддержанием баланса между активацией и ингибированием активности по принципу обратной связи. Повышение концентрации гормонов надпочечников приводит к подавлению гипофизарной секреции или активации секреции статинов [3].

ГГНО является основным нейрохимическим механизмом регуляции тревожности в норме у млекопитающих. Её активация лежит в основе ответа организма на различные стрессовые стимулы, в особенности угрожающие жизни. Показано, что дисрегуляция работы этой системы приводит к различным патологиям, в том числе к тревожным расстройствам и повышенному уровню стресса [216]. Запуск ГГНО начинается с активации мелкоклеточных кортиколибериновых нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса, которые выделяют в области срединного возвышения кортиколиберин (41 а. о.) Он действует через CRHR1 на кортикотропные клетки передней доли гипофиза, что приводит к стимуляции синтеза проопиомеланокортина (ПОМК, 241 а. о.), его ограниченного протеолиза и выделению адренотропного гормона (АКТГ, 39 а. о.) в кровоток. Секреция АКТГ приводит к усилению синтеза и выделению кортизола надпочечниками [222, 361]. Если молекуло-физиологические механизмы действия АКТГ и кортизола изучены детально в течение 20 в., то более подробные данные о работе кортиколиберина как в рамках, так и за пределами ГГНО, были получены только за последние десятилетия. Было открыто, что кортиколибериновые нейроны проецируются не только в срединное возвышение, но также в норадренергическую область голубого пятна и центрального ядра амигдалы, ядро ложа терминальной полоски. Кортиколиберин

помимо гипоталамуса экспрессируется в обонятельных луковицах, центральном ядре амигдалы, ядре ложа терминальной полоски, прилежащем ядре, коре головного мозга, гиппокампе, околосеротониновом сером веществе, ядрах шва, латеральном ядре покрышки, парабрахиальном ядре, ретикулярной формации среднего мозга, голубом пятне, среднем вестибулярном ядре и дорсальном блуждающем комплексе. Если в гипоталамусе кортиколиберин выполняет эндокринную функцию, регулируя работу ГГНО, то в других регионах мозга, в частности в амигдале и голубом пятне, участвует в формировании поведения, памяти, пищевого аппетита и поведенческий ответ на стресс [138, 294]. В целом считается, что кортиколиберин является анксиогенным агентом как в рамках ГГНО, так и в других отделах мозга. Показано, что у крыс воздействие стрессовыми факторами приводит к активации нейронов медиальной обонятельной зоны, имеющих CRHR2, а запуск тревожного поведения происходит через активацию амигдалы. Оттуда кортиколибериновые нейроны посылают проекции в голубое пятно, область дорсального шва и ядро ложа терминальной полоски, обеспечивая их тоническую активность через активацию норадренергической и серотонинергической систем этих областей. Возврат к базовому состоянию тревоги и внимания требует активации CRHR2-нейронов гиппокампа [197, 309, 359, 366].

В процессе ограниченного протеолиза из ПОМК кроме АКТГ также образуются и другие нейропептиды: α -, β - и γ -меланотропин (α -, β - и γ -МСГ), β - и γ -липотропин, β -эндорфин. Связь между тревожностью показана для α - и γ -МСГ и β -эндорфина [237]. α -МСГ связывается с меланокортиновыми рецепторами MC3R и MC4R, γ -МСГ — только с MC3R на нейронах, тесно связанных с NPY-секретирующими нейронами ствола мозга и дугообразного ядра гипоталамуса, участвующих в регуляции тревожности [116]. Показано, что α -МСГ обладает анксиогенным эффектом и действует как антагонист нейропептида Y в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса, прилежащем ядре и дорсальном ядре шва [232]. β -эндорфин и два его производных — α - и γ -эндорфины — являются представителями семейства эндогенных опиатов и участвуют в анальгезии и регуляции ноцицепции. Об их роли в регуляции тревожности известно мало, однако показана способность

других эндогенных опиоидных пептидов — динорфина и энкефалинов — участвовать в процессах активации тревожного поведения. Так, у мышей нокаут генов продинорфина и проэнкефалина или введение антагониста κ-опиоидных рецепторов вело к анксиогенному эффекту [80, 270, 383], а введение аналога энкефалинов или сайленсинг мРНК проэнкефалина исключительно в центральном ядре амигдалы вело к снижению тревожности. Данные факты демонстрируют разнонаправленность действия энкефалинов и их функциональное различие в аспекте регуляции тревожности с другими эндогенными опиоидами [169, 310]. Относительно связи других эндогенных опиоидных пептидов и тревожности известно мало. Известно лишь, что активация ноцицептиновых рецепторов приводит к анксиолитическому эффекту [167].

Способность влиять на тревожное поведение также показана и для аргинин-вазопрессина и окситоцина — двух циклических нейропептидов, родственных семейству кортиколиберинов. Оба синтезируются в мелкоклеточных и крупноклеточных нейронах гипоталамических паравентрикулярного и супраоптического ядер, но кроме срединного возвышения секретируются также и в нейрогипофизе, где найдены проекции крупноклеточных нейронов [197]. В норме вазопрессин регулирует водно-солевой баланс и при высоких концентрациях действует как вазоконстриктор, активирует консолидацию памяти и подавляет реакции, связанные с системой подкрепления. Окситоцин стимулирует лактацию, сокращения матки, умеренный антагонист вазопрессина в процессах консолидации памяти, участвует в половом поведении и работе системы подкрепления [1]. Установлено, что окситоцин ингибирует анксиогенную активность ГГНО, в норме секретируется как в ПНС, так и в ЦНС в ответ на стрессовые факторы как механизм защиты организма от повышенной возбудимости вследствие тревоги [190]. Вазопрессин наоборот, связываясь с V1-рецепторами активирует ГГНО, а у пациентов с тревожно-агрессивным типом депрессии уровень вазопрессина в плазме повышен [172, 287].

Другой группой нейропептидов, связанной с тревожностью, являются тахикинины. Найдена связь между тревожным поведением и концентрацией нейрокинина, нейропептида Y, вещества P и гемокинина-1. Установлено, что у крыс с по-

вышенной тревожностью повышен уровень секреции нейрокина А в поясной коре, стриатуме и околотоводопроводном сером веществе, а антагонисты NK1-рецепторов подавляют тревожность при алкогольной абстиненции [107, 233]. Концентрация вещества Р повышается в стрессовых условиях, включая эмоциональный стресс, что активирует ГГНО и увеличивает активность голубого пятна, миндалы, средней обонятельной зоны, околотоводопроводного серого вещества, вентромедиального ядра гипоталамуса и ядра ложа терминальной полоски за счёт связывания с NK1-рецепторами [142, 201]. У нокаутных по гену гемокина-1 мышей наблюдается повышенный уровень базовой тревожности [85]. Интрацеребровентрикулярное введение нейропептида Y снижает уровень тревожности у крыс, а SNP в гене этого нейропептида у человека повышает влияние психологического стресса в детстве на восприимчивость к тревожности. Показана также способность нейропептида Y модулировать активность холецистокинина-4 и снижать его анксиогенный эффект, а приём эсциталопрама и венлафаксина приводит к повышению уровня NPY в плазме крови [137, 141, 298, 358]. Таким образом получается, что в норме нейропептид Y и гемокин-1 снижает анксиогенную активность мозга в условиях стресса, в то время как другие тахикинины увеличивают.

Наконец, способность влиять на развитие тревожности показана также и для следующих нейропептидов:

- при связывании нейропептида S с его рецепторами в амигдале повышается секреция глутамата, а его сверхэкспрессия приводит к пониженному уровню тревожного поведения [303, 365];
- большое количество орексиновых нейронов найдено в дорсомедиальной части и перифорникальных ядрах гипоталамуса, участвующих в возбуждении, бдительности и мобилизации вегетативной нервной системы. Активация этих нейронов необходима для развития панического состояния. Введение орексинов А и В в паравентрикулярное ядро таламуса приводит к повышению тревожности, а анксиогенный эффект орексина А связан с модуляцией работы глутаматергической, ГАМКергической и норадреналинергической систем [213, 245, 252, 302];

- нокаутные по гену галанина мыши демонстрируют повышенную базовую тревожность. К тому же эффекту приводят и SNP в 3'-UTR гена галанина. Предполагается, что секреция галанина и последующее снижение тревожности является адаптацией и механизмом защиты от чрезмерного стресса, т. к. усиление стрессовой активации норадреналинергической системы приводит к повышению секреции галанина в центральном регионе амигдалы [75, 196, 224];
- несфатин-1 оказывает анксиогенный эффект, который не связан с активацией ГГНО через повышение секреции кортиколиберина [329];
- меланин-концентрирующий гормон активирует стрессовый ответ и вызывает депрессивное и тревожное поведение у животных [341];
- кисспептин и соматостатин действуют как анксиогенный и анксиолитический агент соответственно, т. к. нокаутные по гену рецептора кисспептина мыши демонстрировали сниженный уровень базовой тревожности, а нокаутные по гену соматостатина — высокий [136, 247];
- при высоком уровне тревожности, вызванной стрессовыми воздействиями, в гипоталамусе крыс значительно повышается содержание кокаин-амфетамин-регулируемого транскрипта, а интрацеребровентрикулярное введение CART(55-102) оказывает анксиогенный эффект [54];
- холецистокинин повышает тревожность и усиливает чувство страха, действуя через ССК₂-рецепторы, тем самым модулируя работу ГАМКергической, глутаматергической и дофаминергической систем в базальном стриатуме, коре и гиппокампе [74, 82, 95];
- лептин, вырабатываемый адипоцитами, активирует лептиновые рецепторы на NPY-нейронах в дугообразном ядре гипоталамуса, что приводит к снижению тревожности. У мышей с недостатком лептина наблюдается повышенный уровень тревожного поведения, а нарушение работы лептиновых рецепторов на дофаминергических нейронах вентральной области покрышки, проецируемых в амигдалу, приводит к повышению тревожности [63, 89, 242];

- грелин и кортиколиберин регулируют секрецию друг друга по принципу обратной связи: при стрессе повышается секреция грелина в различных отделах ЖКТ, что приводит к повышению секреции кортиколиберина, а повышенный уровень кортиколиберина понижает уровень экспрессии грелина. Ко всему прочему, у детей с повышенным уровнем тревожности был также повышен и уровень грелина в плазме [73, 297].

Активное внимание исследователей сегодня приковано к роли трёх последних нейропептидов в контексте изучения влияния оси кишечник-мозг (ОКМ) на развитие тревожности. ОКМ представляет собой двунаправленную систему связей между кишечником и ЦНС, через которую происходит передача стимулов в обоих направлениях для регуляции работы головного мозга и кишечника. Работа этой оси в контексте тревожности исследована наиболее бедно, однако существуют публикации о роли кишечной микробиоты и рациона в формировании ряда аффективных расстройств [133, 158, 350].

Таким образом обширный экспериментальный материал по изучению роли различных пептидергических систем показывает, что тревожность является комплексным явлением, регуляция развития которого многоступенчата и нарушается при аффективных патологиях. Часть работ указывает на то, что именно нейропептидам принадлежит главенствующая роль в регуляции тревожного поведения, т. к. именно они являются модуляторами работы классических нейромедиаторных систем в регионах мозга, участвующих в обработке стрессовых стимулов и запуске процессов адаптации к ним.

Ферменты обмена нейропептидов. Регуляция работы различных пептидергических систем может достигаться также за счёт изменения активности ферментов их обмена. К таковым относятся различные ферменты, использующие пептиды в качестве субстратов, но ведущую роль в этих процессах отводят различным гидролазам, участвующим в каскадах ограниченного протеолиза как самих нейроактивных пептидов, так и их предшественников [3]. В данной работе мы сконцентрировали наше внимание на изучении влияния пептидов массой до 5 кДа, выделенных из продуктов пчеловодства, на активность пептидил-дипептидазы А и кар-

боксипептидазы E как ферментов, вовлечённых в метаболизм нейропептидов, участвующих в регуляции тревожного поведения и реализации поведенческого ответа организма на стресс.

Пептидил-дипептидаза A (ангиотензинпревращающий фермент I, ACE, КФ 3.4.15.1) — фермент класса гидролаз, катализирующий отщепление C-концевого дипептида вида XY, где X — любая аминокислота, но не пролин, Y — любая аминокислота, но не аспарагиновая или глутаминовая.

У человека ген *ACE* локализован в длинном плече 17-й хромосомы (локус 17q23.3), длина — 21 319 н. п., состоит из 25 или 26 экзонов. Продуктом гена являются два разных полипептида вследствие использования двух разных промоторов — тестикулярная и соматическая формы. Первая экспрессируется только в яичках и транскрибируется с промотора, расположенного на 12-м интроне, состоит из одного домена и имеет один каталитический сайт, тогда как соматическая состоит из двух гомологичных доменов с одним каталитическим сайтом на каждом [323]. Такой характер экспрессии гена объясняется его дупликацией незадолго до кембрийского взрыва во времена появления хордовых [281].

Соматическая форма была открыта первой Skeggs с соавт. в 1954 г. [349], а на сегодня секвенировано 4 разных изоформы фермента, две из которых соматические, две — тестикулярные (1 306 а. о., 1 145 а. о., 732 а.о., 691 а. о., молекулярные массы 149,7 кДа, 131,7 кДа, 83,3 кДа и 78,7 кДа соответственно), разные в длину из-за альтернативного сплайсинга [299]. Фермент представляет собой мембранный гликопептид, экспрессируемый на поверхности эпителиальных и эндотелиальных клеток (молекулярная структура на рис. 1). Экспрессируется практически во всех тканях, но наибольшее содержание фермента наблюдается в лёгких, почках, кровеносной системе и тестикулах, небольшая часть свободно циркулирует в крови за счёт протеолитического шеддинга с мембран эндотелиоцитов [357]. Оптимальные значения pH лежат в пределах от 7 до 8,5, pI — 5,1-5,2, ингибируется хелаторами, природными и синтетическими пептидами и рядом непептидных ингибиторов, используемыми в качестве лекарственных средств [202]. Активность зависит от присутствия ионов Zn^{2+} в активном центре и Cl^- в реакционной среде, ка-

тализ идёт по механизму, схожему с механизмом карбоксипептидазы А: ион цинка связывается с молекулой воды, переносит протон на Glu₃₈₄ и нуклеофильно атакует карбонильную группу при разрываемой пептидной связи, а затем Glu₃₈₄ отдаёт протон для разрыва С-N связи [398]. Несмотря на наличие у соматической формы ПДПА двух каталитических центров, было открыто, что они функционально различны, т. к. ингибирование N-концевого не приводит к изменениям в уровне артериального давления, однако этот активный центр может расщеплять β-амилоидный пептид и другие субстраты [215, 292].

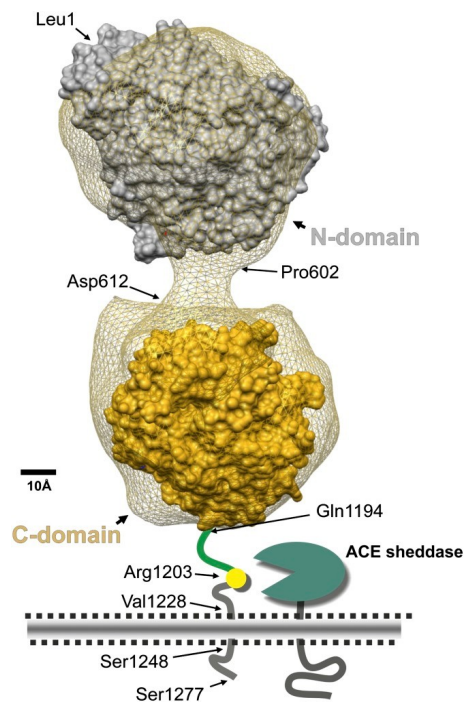


Рисунок 1. Модель соматической изоформы ПДПА. Сеть — форма свиной ПДПА; ACE sheddase — связанна с мембраной протеаза для отщепления ПДПА от мембраны (иллюстрация по [77])

Наиболее полно исследована роль ПДПА в регуляции артериального давления в составе ренин-ангиотензиновой системы (ПДПА гидролизует отрыв С-концевого дипептида His-Leu от ангиотензина I, превращая его в активный ангиотензин II) и кинин-калликреиновой системы (расщепляет Pro-Phe связь брадикинина) [82], поэтому ингибиторы этого фермента нашли широкое клиническое применение как лекарственные препараты, снижающие артериальное давление. Одна-

ко круг субстратов ПДПА не ограничивается этими двумя пептидами, и фермент гидролизует вещество Р, холецистокинин, гонадолиберин, β -неоэндоρφин, динорфин, нейротензин, фезалимин, амиды лей- и мет-энкефалинов, В-цепь инсулина, гастрин, геморегуляторный пептид AcSDKP, ангиотензин 1-7 [66, 82, 131, 144, 353, 355, 356].

Роль тестикулярной формы ПДПА активно исследуется, однако было показано, что её активность является ключевым фактором для фертильности. Фермент, помимо пептидгидролазной активности, также обладает способностью отщеплять мембранные белки, заякоренные через гликозилинозитолфосфат, которая не ингибируется классическими ингибиторами её протеазной активности [235].

Большое число тканей, где экспрессируется ПДПА, а также её субстратное разнообразие объясняет широкий круг физиологических процессов, в работу которых вовлечён данный фермент. Генетические полиморфизмы гена *ACE* связаны с развитием таких заболеваний, как болезни сердечно-сосудистой системы, почек, диабет второго типа, системная красная волчанка, болезнь Альцгеймера [114], ОКР, шизофрения, биполярное расстройство первого и второго типов [55].

Такая широкая вовлечённость ПДПА в физиологические процессы и способность расщеплять ряд нейропептидов делает этот фермент перспективным объектом исследования для изучения нейрогуморальной регуляции поведения, в том числе и развития тревожности.

Карбоксипептидаза E (карбоксипептидаза H, энкефалинконвертаза, CPE, КФ 3.4.17.10) — карбоксипептидазо-В-подобный фермент класса гидролаз, катализирующий отщепление Arg или Lys с С-конца полипептида. Впервые фермент описан в 1982 г. Fricker с соавт. [161].

У человека ген *CPE* локализован на длинном плече 4-й хромосомы (локус 4q32.3), длина 137 353 н. п., 9 экзонов. С гена транскрибируется две изоформы фермента: нормальная (476 а. о., 53,2 кДа; рис. 2) и CPE-ΔN (440 а. о., 49,8 кДа), получаемая в результате сдвига рамки считывания, усечённая с N-конца [300]. Также в результате другого варианта альтернативного сплайсинга может экспрессироваться неактивная укороченная форма, встраиваемая в эндосомы и экспониру-

емая на поверхность клетки, действующая как рецептор [117].



Рисунок 2. Структура карбоксипептидазы E, сгенерированная AlphaFold

Нормальная форма фермента в клетках представлена в двух вариантах: растворимая 53,2 кДа и мембраносвязанная 55 кДа [210]. Первая участвует в процессинге многих нейропептидов и пептидных гормонов, тогда как вторая форма заякорена за С-конец в мембранах секреторных гранул и участвует в сортировке прогормонов и пропептидов, синтезированных в комплексе Гольджи [130], а также участвует в передаче межклеточных сигналов [210]. CPE-ΔN широко экспрессируется в клетках злокачественных опухолей и является активатором ряда генов метастазирования [186].

Нормальная форма найдена практически во всех тканях, наибольшая активность наблюдается в органах, где активно проходит процессинг регуляторных пептидов: мозг и различные железы внутренней и смешанной секреции, а также в сердце. рН-оптимум 5,5-5,6, рI 5, ингибируется хелаторами, GEMSA и другими сульфгидрильными агентами, а также рядом биологически активных пептидов [203]. Для работы фермента необходимы ионы Zn^{2+} или Co^{2+} .

Значение нормальной работы карбоксипептидаз E для функционирования организма поистине велико и находит отражение в большом спектре субстратов, метаболизируемых ею, и целом ряде заболеваний, возникающих вследствие нарушения её экспрессии. Показано, что КПЕ использует как субстрат мет- и лей-энкефалин, мет-энкефалин-Arg₆, АКТГ(1-17), предшественники вазопрессина и окситоцина, амилин, проинсулин, переносчик дофамина, ПОМК, просоматостатин,

нейропептид Y, секретогранин I и II, proSAAS, кортикотропин-липотропин, холецистокинин-8, глюкагоноподобный пептид-1, CART, ряд ферментов и структурных белков общего метаболизма [103, 118, 160, 161, 264, 400].

Данные по нокауту гена *CPE* указывают, что фермент участвует в ремоделинге костной ткани, поддержании фертильности, фоторецепции и синаптической передачи сигнала, регуляции памяти и метаболизма, действует как нейропротекторный фактор [126, 210, 228, 244, 407]. Несколько лет назад был описан моногенный BDV-синдром человека, связанный с потерей активности КПЕ, симптомами которого являются детское ожирение, задержка нейropsychического развития, гипогонадотропный гипогонадизм и гипотиреоз [90].

Также было найдено, что КПЕ необходима для нормальной обработки стрессовых стимулов и правильного развития гиппокампа, т. к. *Cpe^{fat/fat}* мыши, нокаутные по соответствующему гену, демонстрировали тревожное и депрессивное поведение и дегенерацию нейронов этого отдела мозга [117], а при повышенной тревожности в амигдале повышается содержание мРНК КПЕ в 1,2 раза [234]. Вовлечённость карбоксипептидазы E в регуляцию тревожности делает актуальным дальнейшее исследование её роли в развитии подобного поведения в норме и при патологии.

* * *

Таким образом, низкая изученность биологической активности низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства и малое количество исследований в области влияния пчелопродуктов на поведение обосновывают актуальность и научную ценность поставленной цели. Изучение влияния пептидов массой до 5 кДа, выделенных из маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда, на различные аспекты жизнедеятельности живых организмов помогут достичь более глубокого понимания путей биохимической регуляции.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование было проведено на базе лабораторий ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». Выбор маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда как источников для выделения пептидов обусловлен наличием антибактериальной и анксиолитической активности у данных продуктов пчеловодства, а также присутствием пептидов в их составе. Образцы пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода были получены с частных пасек Пензенской области (Пензенский («Лесная поляна»), Кузнецкий и Камешкирский районы). Порода пчёл во всех случаях — «Карника» (краинка, *Apis mellifera carnica*). Пчёлы данной породы отличаются серым окрасом, масса при выходе из ячейки 80-90 мг, длина хоботка 6,5-6,7 мм. По литературным данным маточное молочко данных пчёл характеризуется самым высоким содержанием белков [4].

Молекулярная масса пептидов продуктов пчеловодства была оценена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (30% Т, 2,67% С) в денатурирующих условиях (по Лэммли). Разделяющий гель 20%-й концентрации готовили на 1,5 М Трис-НСl буферном растворе (рН = 8,8), концентрирующий (7%) — на 0,5 М Трис-НСl буферном растворе (рН = 6,8). Образцы предварительно смешивали в соотношении 1:1 с буфером для образцов (50 мМ Трис-НСl, рН = 6,8, содержащий 0,5% SDS, 2 мМ ЭДТА, 0,01% кумасси G-250 и 12%-й р-р глицерина) и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 минут. Разделение проводили с использованием электрофоретической системы Mini-Protean от BioRad (толщина геля 0,75 мм, размер стёкол 8,3×7,3 см) при силе тока 30 мА. При каждом разделении в качестве маркеров молекулярной массы использовали набор маркеров с ультра низким диапазоном масс от Sigma Aldrich (1,060-26,600 Да).

После разделения пластины геля промывали дистиллированной водой и инкубировали в течение 30 мин в растворе-фиксаторе (0,2 М р-р ацетата натрия, приготовленный на 30%-м р-ре этанола, содержащий 0,2%-й р-р глутарового альдегида). После фиксации пластины геля окрашивали в течение 30 мин в 0,1%-м р-ре кумасси R-250, приготовленном на 30%-м р-ре метанола, содержащем 5%-й р-р

уксусной кислоты. Для отмывки фона пластины геля замачивали на ночь в 30%-м р-ре этанола, содержащем 5%-й р-р уксусной кислоты.

Полученные пластины геля сканировали на лазерном сканере и анализировали с применением ПО ImageJ с набором макросов MolWt.

Для получения пептидов массой 5 кДа из пчелиного мёда, маточного молочка и личинок трутневого расплода был разработан способ их выделения и очистки, состоящий из комбинации ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации.

Из пчелиного мёда был приготовлен водный 50%-й р-р, из маточного молочка — 10%-й, которые затем были профильтрованы через бумажный фильтр марки «красная лента» для удаления механических загрязнений. Из личинок трутневого расплода возрастом 5-7 суток был приготовлен 10%-й гомогенат на водной основе, который затем центрифугировали в течение 20 мин при 3000 g для удаления клеточного дебриса. Поверхность супернатанта промакивали бумажным фильтром для снятия липидной плёнки и надосадочную жидкость использовали для дальнейших манипуляций.

Фильтрованные растворы маточного молочка, трутневого расплода и супернатант гомогената трутней пропускали через ультрафильтрационную мембрану VivaFlow 200 с порогом отсечения 5 кДа. Полученный пермеат был очищен от низкомолекулярных примесей с использованием ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с однократной сменой буферного раствора (сорбирующий буфер — 0,2 М Трис-HCl (pH=10), десорбирующий — 0,2 М Na-цитратный (pH=6); размер колонки — 6×1,5 см, объём наносимой пробы 500 мкл, скорость элюции до 30 мл/час). Контроль содержания примесей осуществляли спектрофотометрически по присутствию фруктозы в реакции с резорцином в кислой среде [45], концентрацию белковых компонентов во фракциях определяли методом Лоури [251] (в обоих случаях использовали метод калибровочной прямой: по фруктозе и БСА соответственно). Отсутствие фенольных и стероидных соединений определяли спектрофотометрически с FeCl₃ [347]. Фракции после десорбции, не содержащие примесей, объединяли и лиофилизировали, перерастворяли в 1 мл дистиллированной

воды и очищали от солей буферных растворов гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (размер колонки — 15×2 см, скорость элюции — не более 30 мл/час). Наличие пептидов во фракциях определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм на спектрофотометре Varian Cary 50. Очищенные таким образом фракции доводили до необходимой концентрации и использовали в дальнейших экспериментах.

Разнообразие пептидов в очищенных фракциях продуктов пчеловодства было изучено с помощью ОФ-ВЭЖХ. Использовали хроматографическую систему NGC Quest 10 Plus со спектрофотометрическим детектором, колонка SUPELCOSIL LC-18-T 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Перед анализом пробы подвергали делипидизации: смешивали в течение 15 минут с равным объёмом гексана и центрифугировали в течение 10 минут при 2000 g. Нижний слой жидкости фильтровали через стерильный мембранный фильтр 0,22 мкм и использовали для анализа. Разделение выполняли в градиенте элюции от буфера А — водный 0,1%-й р-р трифторуксусной кислоты, до буфера В — 0,1%-й р-р трифторуксусной кислоты в 50%-м ацетонитриле. Детекцию вели по поглощению на длинах волн 220 и 280 нм. Анализ хроматограмм проводили в ПО ChromLab.

Для *in vitro* определения антибактериальной активности образцов растворов маточного молочка, гомогената личинок трутневого расплода и пчелиного мёда, а также соответствующих пептидов, был использован метод диффузии изучаемых компонентов с дисков в среду с тест-культурой с оценкой зоны задержки роста [76]. Для этого образцы культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae*, высеянные с раневых поверхностей больных, были выращены на сахарном бульоне (мясо-пептонный бульон, содержащий 2% глюкозы), идентифицированы морфологически и снова пересеяны на стерильный сахарный бульон для получения чистой накопительной культуры. Суспензия микроорганизмов накопительной культуры была доведена до 0,5 по стандарту МакФарланда и использована для газонного посева твёрдого АГВ-агара или агара Мюллера-Хинтона в чашках Петри.

На поверхность полученных инокулятов с питательной средой помещали стерильные бумажные диски диаметром 6 мм, пропитанные изучаемым раствором в определённой концентрации, 10 мкл 0,9%-го раствора NaCl в качестве отрицательного контроля и цефтриаксон в качестве положительного (10 мкг/диск). После суток инкубации при 37 °С были измерены величины зоны задержки роста бактерий. За пограничные значения чувствительности бактерий к действию пептидов было выбрано значение диаметра зоны задержки роста в 18 мм (в соответствии со средним значением чувствительности к цефалоспорином по данным EUCAST).

Для определения минимальной ингибирующей концентрации использовали водные растворы пептидов массой до 5 кДа, выделенных из маточного молока, личинок трутневого расплода и пчелиного мёда, которые смешивали с равным объёмом питательной среды (АГВ- или агар Мюллера-Хинтона) до конечного объёма 1,5 мл и концентрации 50, 20 и 10 мкг/мл. Затем полученную питательную среду инокулировали образцами микроорганизмов и оставляли на сутки для инкубации при 37 °С, после чего визуально оценивали присутствие или отсутствие развития бактериальной культуры. В качестве контрольных проб использовали пробы с теми же культурами, среда для которых была смешана со стерильным 0,9%-м р-ром NaCl. Критерием наличия антибактериальной активности считали отсутствие роста микроорганизмов во всех пробах одной повторности.

Для определения влияния пептидных фракций на каталазную и общую дегидрогеназную активность бактерий из накопительных культур *S. aureus* и *E. coli* были приготовлены суспензии бактерий мутностью 0,5 по МакФарланду, использованные для инокуляции 3 мл стерильного сахарного бульона. После суток инкубации при 37 °С в образцы питательных сред опытной группы были добавлены пептидные фракции, выделенные из продуктов пчеловодства, в концентрации 100 мкг/мл (объем 50 мкл), в контрольные — 50 мкл 0,9%-го стерильного р-ра NaCl, и пробы были снова убраны в термостат на 24 ч при тех же условиях. Затем к пробам добавляли 100 мкл 0,02%-го р-ра тритона X-100 и гомогенизировали в течение 10 мин. После гомогенизации содержимое инкубировали 2 ч при 4 °С, а затем центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g. Бесклеточный супернатант

использовали для определения ферментативной активности [24]:

- для определения общей дегидрогеназной активности к 2,5 мл супернатанта добавляли 0,3 мл 3%-го водного р-ра 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида, перемешивали и инкубировали 12 ч при комнатной температуре. После инкубации смешивали с равным объёмом гексана для экстракции образовавшегося формазана и измеряли интенсивность поглощения экстрагированной фазы на спектрофотометре Varian Cary 50 при длине волны 485 нм (длина оптического пути 1 см, контроль — чистый гексан). Полученные результаты оптической плотности пересчитывали на 1 мг белка в пробе по формуле $(D/C_{\text{белка}}) \times 1000$.
- для определения каталазной активности к 0,1 мл супернатанта добавляли 2 мл 0,03%-го р-ра пероксида водорода и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 1 мл 4%-го р-ра молибдата аммония в 0,1 н растворе серной кислоты и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Varian Cary 50 при длине волны 410 нм (контроль — 0,1 мл дистиллированной воды, смешанной с теми же реактивами). Активность каталазы вычисляли по формуле и выражали в мкат на мкг белка:

$$A = \frac{D_{\text{опыт}} \cdot V \cdot t \cdot 22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}}{C_{\text{белка}}},$$

где V — объём вносимой пробы, л; t — время инкубации, с.

Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури.

Концентрацию пероксида водорода в образцах растворов пчелиного мёда, используемых для определения антибактериальной активности, определяли титриметрически [7]: к 20 мл исследуемого раствора добавляли 5 мл 10%-го р-ра иодида калия, такой же объём 10%-го р-ра серной кислоты и выдерживали в закрытой посуде без доступа света в течение 10 минут. После инкубации раствор титровали 0,1 М раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания. Массовую долю рассчитывали по формуле $(V \times 0,0017 \times 100) / 20$, где V — объём пошедшего на титрование тиосульфата натрия. Полученную массовую долю пересчитывали на содержание в мкг/мл.

Для оценки влияния пептидов продуктов пчеловодства на поведение в условиях хронического стресса в качестве экспериментальных животных использовали самцов крыс линии Wistar массой 190-210 г (2 мес., $n = 8$), рассортированных в экспериментальные группы по принципу аналогов. Животные были получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР» (Суздальский р-н Владимирской области). Крысы содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище, день и ночь по 12 ч каждый (если экспериментом не было предусмотрено иное). Принципиальная схема проведения эксперимента с животными представлена на рис. 3.

Экспериментальное исследование проводилось в два этапа. На первом этапе проводили оценку биологических эффектов индивидуальных фракций низкомолекулярных пептидов и подбор дозы. На втором этапе была проведена оценка биологической активности смеси низкомолекулярных пептидов.

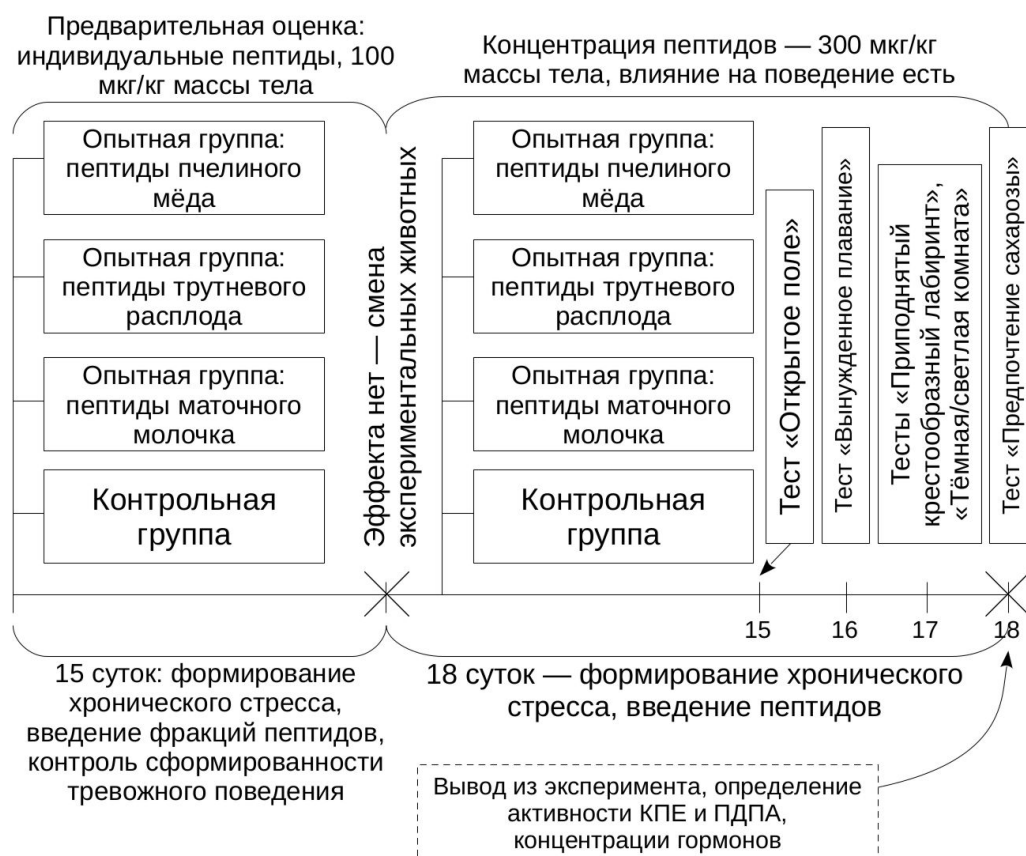


Рисунок 3. Принципиальная схема эксперимента по оценке влияния пептидов продуктов пчеловодства на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса

Для формирования состояния хронического стресса была выбрана модель хронического случайного умеренного стресса, в соответствии с которой на животных оказывается воздействие случайно выбранными стрессовыми факторами несколько раз в сутки [381]:

1. Оставление без воды на 24 ч, иммобилизация в рестрейнере на 50 мин.
2. Содержание в ночные часы с включённым светом (свет 24 ч), содержание при 4 °С в течение 1 ч.
3. Содержание в тёмное в течение 5 ч в дневное время, вынужденное плавание в течение 5 мин.
4. Иммобилизация в рестрейнере на 50 мин, содержание в ночные часы с включённым светом.
5. Оставление без воды на 24 ч., содержание при 4 °С в течение 1 ч.
6. Помещение клетки с грызунами на шейкер (300 грт) в течение 50 мин, содержание в тёмное в дневное время в течение 5 ч.
7. Содержание при 4 °С в течение 1 ч, содержание в ночные часы с включённым светом.
8. Оставление без воды на 24 ч, вынужденное плавание в течение 5 мин.
9. Помещение клетки с грызунами на шейкер в течение 50 мин, содержание в дневное время в темноте в течение 5 ч.
10. Вынужденное плавание в течение 5 мин, содержание в ночные часы с включённым светом.
11. Содержание при 4 °С в течение 1 ч, содержание в ночные часы с включённым светом.
12. Помещение клетки с грызунами на шейкер в течение 50 мин, содержание в дневное время в темноте в течение 5 ч.
13. Оставление без воды на 24 ч, содержание в ночные часы с включённым светом.
14. Иммобилизация в рестрейнере на 50 мин, содержание при 4 °С в течение 1 ч.
15. Содержание в дневное время в темноте в течение 5 ч.

Параллельно с формированием хронического стресса животным опытных групп интраназально вводили водные растворы пептидов в объёме 8 мкл. Для предварительной оценки биологической активности выделенных пептидов экспериментальным животным вводили индивидуальные фракции пептидов в концентрации 100 мкг/кг массы тела. После того как было установлено, что индивидуальные пептиды в такой концентрации не оказывают влияния на поведение крыс, формирование хронического стресса было начато заново с новыми животными. На этом этапе крысам вводили смесь очищенных пептидов продуктов пчеловодства в концентрации 300 мкг/кг массы тела, что согласуется со сложившейся практикой исследований биологически активных пептидов с интраназальным способом введения [336]. Особям контрольной группы вводили стерильный 0,9% р-р NaCl в том же объёме и в то же время, что и животным опытных групп.

Для оценки уровня тревожности животных использовали такие стандартные поведенческие тесты, как «Открытое поле», «Вынужденное плавание», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Тёмная/светлая комната», «Предпочтение сахарозы» [43]. Во всех случаях тестирование было проведено в отдельном помещении, не соединённом с помещением, в котором содержались животные до и в течение эксперимента. До начала каждого теста крысы были оставлены в клетке-переноске на 10 минут для акклиматизации к новому помещению. Во время того или иного теста не допускалось воздействия на животных раздражающих факторов, таких как громкие звуки, вспышки света и т. д. Опытные установки после каждого животного очищали бумажной салфеткой, смоченной 96%-м этанолом, для удаления запахов и дезинфекции.

После проведения поведенческих тестов животные были выведены из эксперимента путём декапитации на гильотине (производитель ООО «Открытая наука») с последующим сбором крови в вакуумные пробирки LumiMed с активатором свёртывания и забором надпочечников, гипофиза, гипоталамуса, стриатума, гиппокампа, миндаля, четверохолмия и продолговатого мозга. Из образцов крови была выделена сыворотка путём центрифугирования при 2000 g в течение 15 минут.

В сыворотке крови для подтверждения формирования стрессового состояния определена **концентрация кортикостерона и АКТГ** методом ИФА с применением коммерческих наборов фирм Хема и Cloud Clone.

В нервной ткани и сыворотке крови была определена **активность ПДПА**: к 40 мкл гомогената ткани или сыворотки крови добавляли 20 мкл 100 мМ Трис-НСl (рН = 7,6) — опыт, и к 40 мкл гомогената 20 мкл 35 мкМ р-ра каптоприла в 100 мМ Трис-НСl (рН = 7,6) — контроль. После 8 минут преинкубации при 37 °С к пробам добавляли 10 мкл 5 мМ р-ра карбоксибензоил-гли-гли-арг, приготовленного на том же буферном растворе и инкубировали при 37 °С в течение 120 минут. Реакцию останавливали прибавлением 30 мкл 10%-го р-ра ТХУ, пробы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 минут, и в 50 мкл надосадочной жидкости определяли количество гли-арг нингидриновым методом на КФК-3 [26]. Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури. Активность фермента определяли как разность в накоплении продукта реакции между опытными и контрольными пробами и выражали в нмоль гли-арг, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мкг белка.

В надпочечниках и нервной ткани была определена **активность КПЕ**: к 50 мкл гомогената изучаемой ткани добавляли либо 150 мкл 50 мМ натрий-ацетатного буфера с 50 мМ NaCl (рН = 5,6) — опытная проба, либо 140 мкл того же буферного раствора и 10 мкл 25 мкМ водного раствора GEMSA (ингибитор) — контрольная. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 60 минут, после чего добавляли 50 мкл 1 М р-ра HCl для остановки реакции. Для экстракции продукта — дансил-фен-ала — к пробам приливали 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивали в течение 1 минуты, после чего центрифугировали при скорости 1000 об/мин в течение 10 минут. Флюоресценцию хлороформенной 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 флюоресценции между опытными и контрольными пробами и выражали в нмоль дансил-фен-ала, образовавшегося за 1 минуту в пересчёте на 1 мг белка [26].

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

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Характеристика пептидного спектра продуктов пчеловодства с применением хроматографических методов и электрофореза

Для оценки содержания пептидных продуктов в пчелином мёде и маточном молочке был использован метод гель-фильтрации на сефадексе G-25 с предварительным осаждением белковых продуктов 10%-м р-ром трихлоруксусной кислоты. При сравнении хроматограмм до осаждения и после было получено, что в пчелином мёде и маточном молочке в среднем 50% от белков приходится на пептиды [6] (рис. 4 и 5).

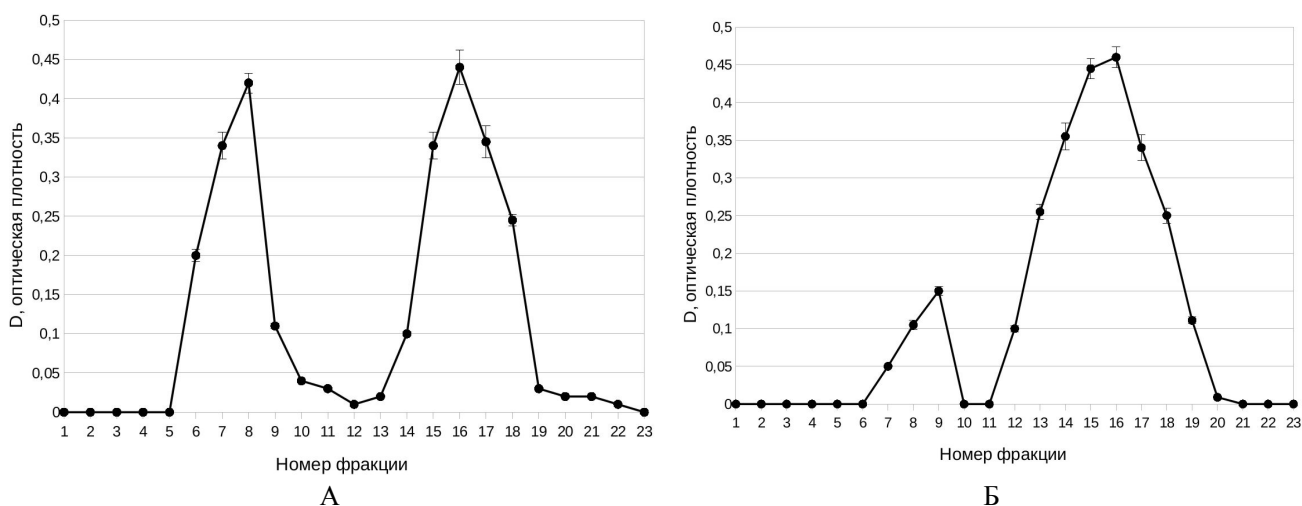


Рисунок 4. Профили элюции Лоури-положительных продуктов пчелиного мёда на сефадексе G-25 до (А) и после (Б) осаждения белков трихлоруксусной кислотой

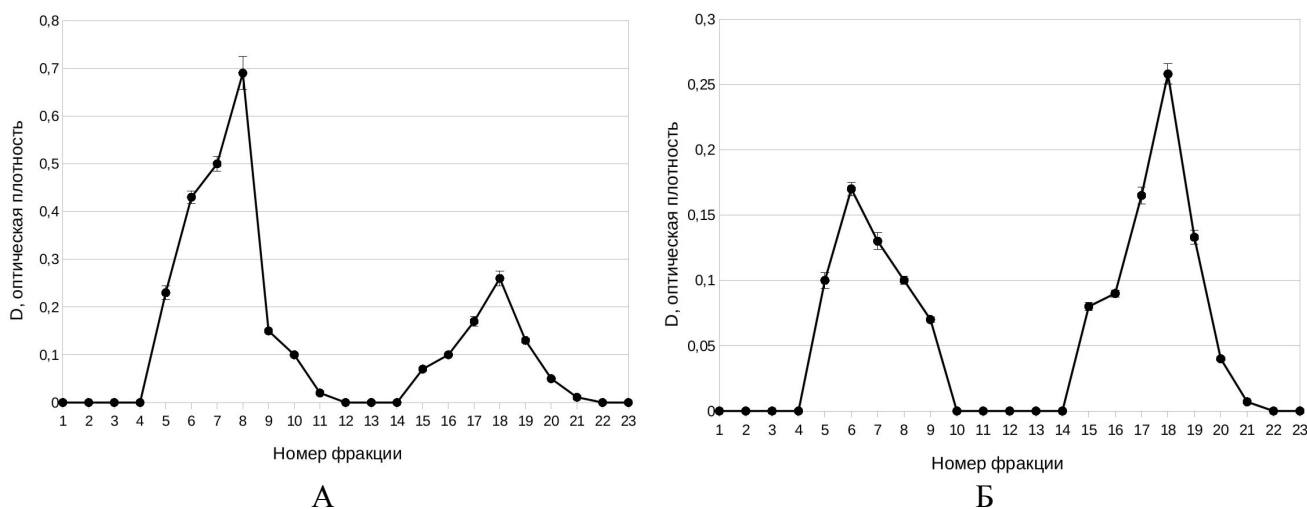


Рисунок 5. Профили элюции Лоури-положительных продуктов маточного молочка на сефадексе G-25 до (А) и после (Б) осаждения белков трихлоруксусной кислотой

На рис. 6 представлен типичный профиль элюции раствора пептидов продуктов пчеловодства, полученного после ультрафильтрации, при их разделении методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

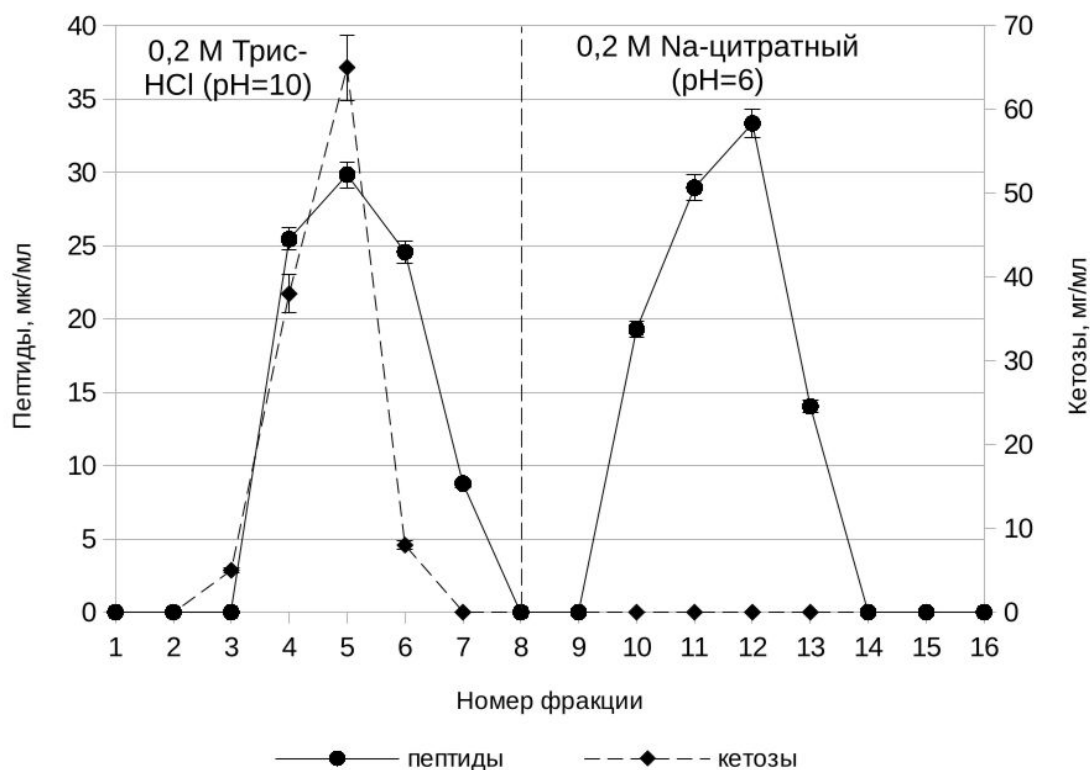


Рисунок 6. Типичный профиль элюции пептидов продуктов пчеловодства на DEAE-целлюлозе

Анализ профилей элюции позволяет заключить, что часть пептидов не удаётся отделить от низкомолекулярных примесей, однако во всех случаях — при разделении ультрафильтратов пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода — соотношение сорбированных на носитель пептидов к несорбированным было 40-50%, которое не менялось при изменении объёма носителя в колонке, т. е. такое распределение пептидов отражает их физико-химические свойства.

При контроле концентрации белковых продуктов с использованием метода Лоури на всех этапах выделения и очистки было получено, что после ионообменной хроматографии из трутневого расплода в виде низкомолекулярных пептидов удаётся выделить в среднем 1,6% белковых веществ, из маточного молочка 5%, из пчелиного мёда 12,1% (в пересчёте на общее содержание белковых веществ). Низ-

кий выход объясним, во-первых, малой долей пептидов в общем содержании белковых молекул в продуктах пчеловодства. Во-вторых, во время очистки ультрафильтрата методом ионообменной хроматографии около половины пептидов не поддаётся очистке из-за невозможности их разделения в заданных условиях, поэтому практический выход меньше теоретического минимум на 40-50%.

Результаты по разделению нативных растворов продуктов пчеловодства и их ультрафильтратов методом электрофореза в полиакриламидном геле при денатурирующих условиях представлены на рис. 7.

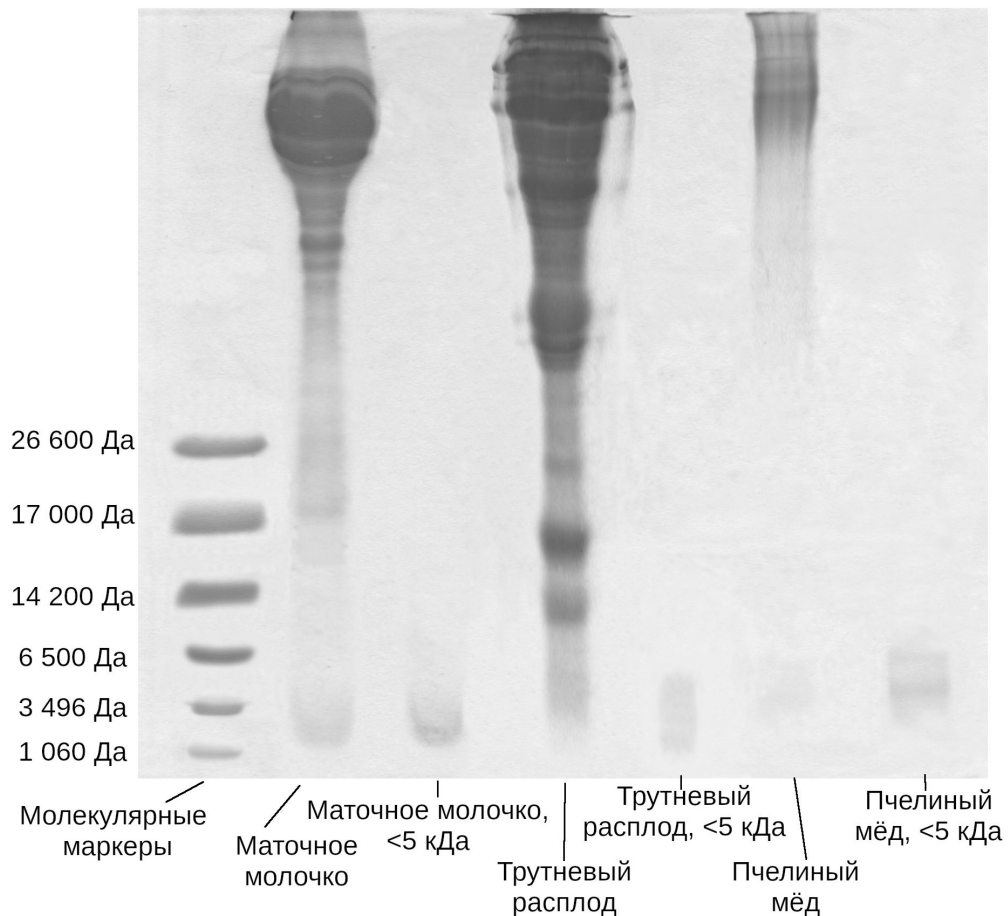


Рисунок 7. Результаты электрофореза растворов продуктов пчеловодства

Результаты по оценке молекулярной массы пептидных фракций продуктов пчеловодства представлены на рис. 8. При расчёте линейной регрессии по полученным денсимоетрическим данным дорожки молекулярных маркеров коэффициент корреляции составил -0,96, что в соответствии с методикой макроса MolWt является показателем достоверности.

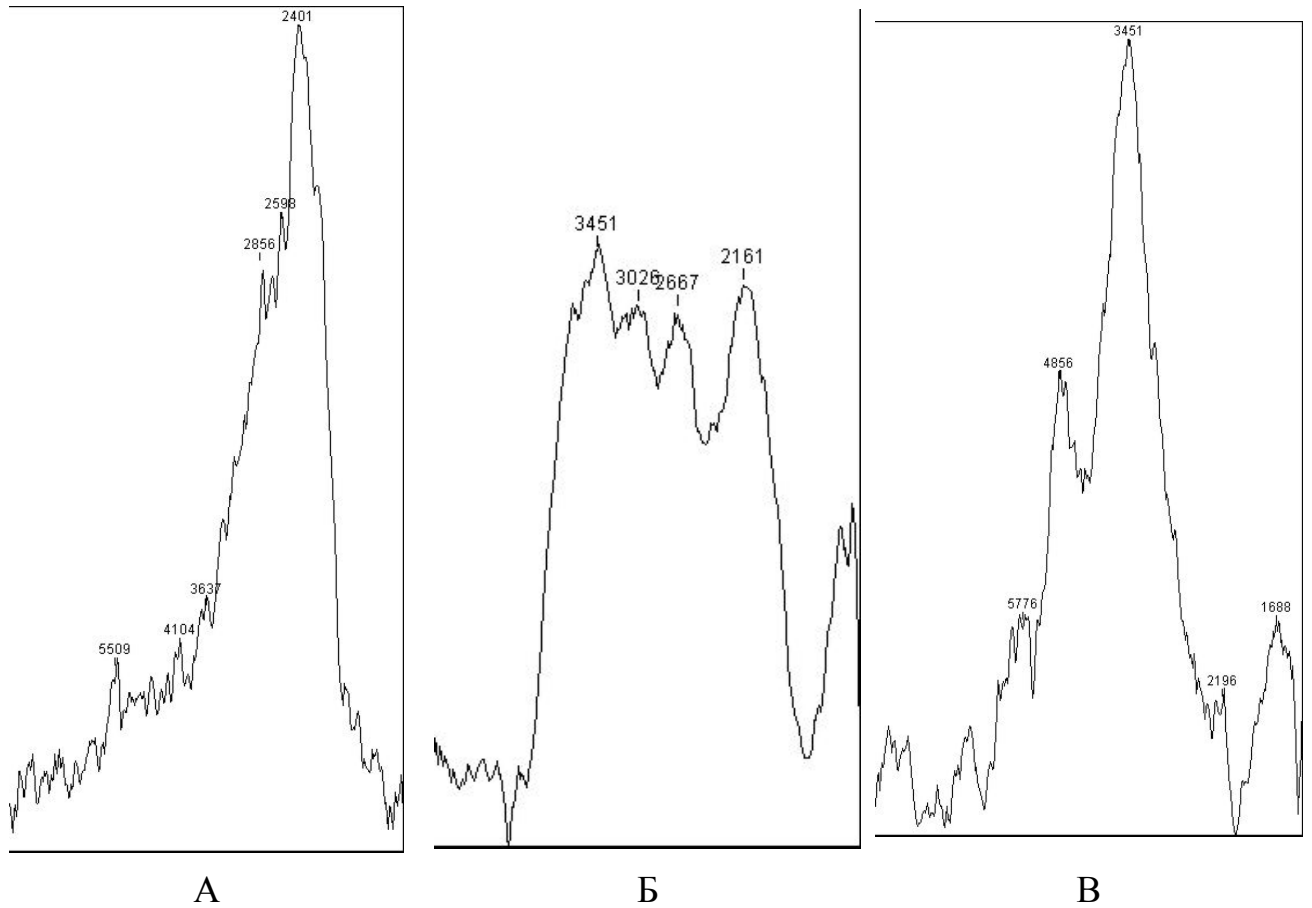


Рисунок 8. Молекулярная масса пептидов ультрафильтрата маточного молочка (А), трутневого расплода (Б) и пчелиного мёда (В)

Присутствие в обработанных данных пиков, соответствующих пептидам с массой более 5 кДа можно объяснить особыми физико-химическими свойствами отдельных пептидных молекул. При незначительно большей порога молекулярной массе данные пептиды имеют схожий размер глобул с более лёгкими пептидами, что позволяет им проходить через поры фильтра, однако молекулярные массы всех пептидов не отличаются более чем на 1 кДа, чем пороговое значение мембраны.

На рис. 9-11 представлены профили элюции образцов ультрафильтрата и очищенных растворов пептидов маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда, полученные с использованием ОФ-ВЭЖХ. Количественные параметры пиков с данных рисунков представлены в табл. 1-3. Из хроматограмм следует, что пептидный состав изученных продуктов пчеловодства отличается значительным разнообразием [23].

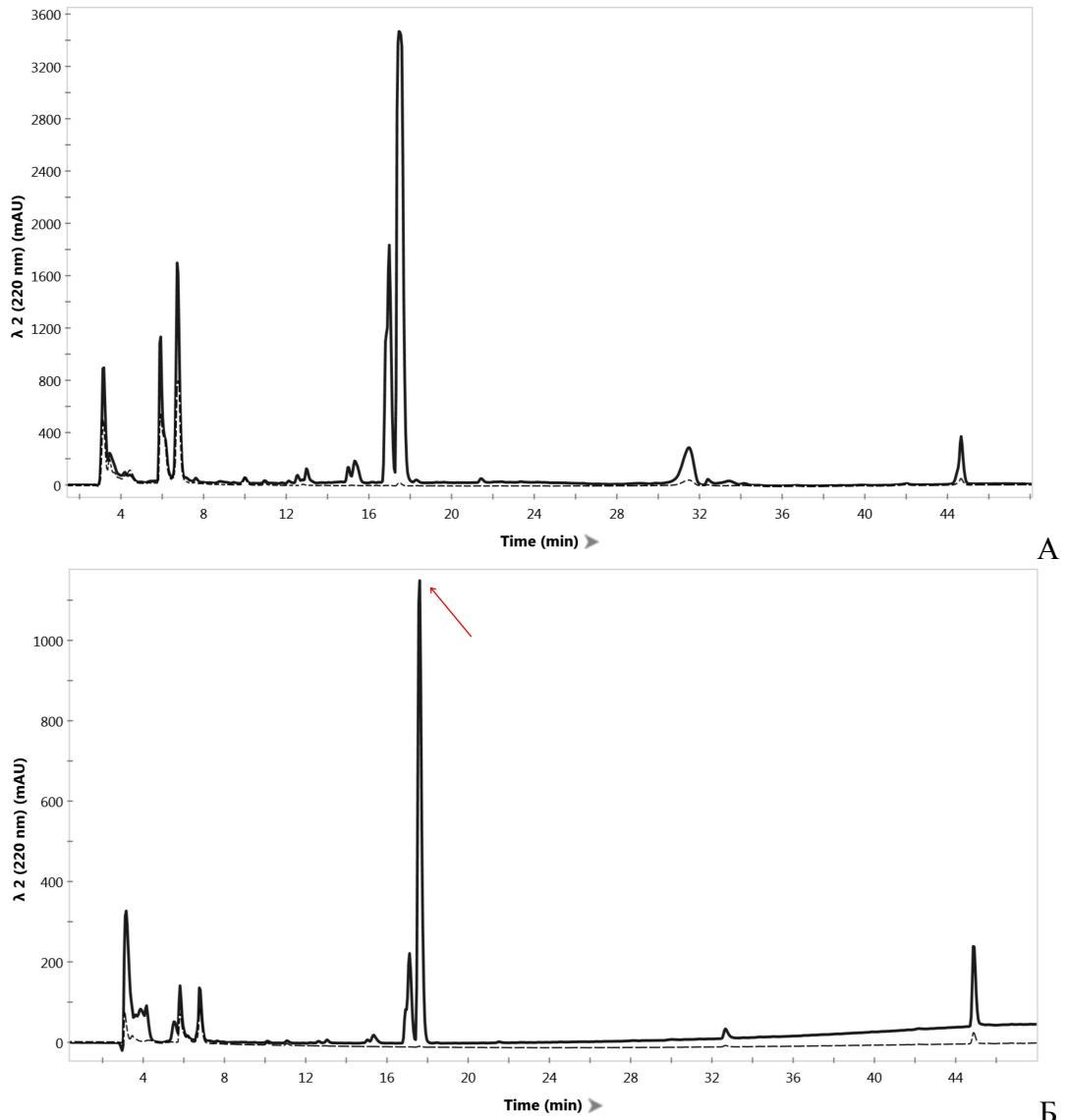


Рисунок 9. Хроматограммы ВЭЖХ-разделения ультрафильтрата (А) и очищенного пептидного раствора (Б) маточного молочка; штрих — поглощение на длине волны 280 нм, сплошная линия — поглощение на длине волны 220 нм

Таблица 1. Количественные параметры пиков ВЭЖХ-разделения пептидов маточного молочка

	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %
	А	1	3,15	5,81	4	12,99	0,71	7	17,46
2		5,9	8,74	5	15,34	1,82	8	31,49	6,54
3		6,73	11,79	6	16,98	17,91	9	44,66	3,36
Б	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %
	1	3,14	16,69	4	-	-	7	17,59	49,95
	2	5,8	5,14	5	15,36	1,12	8	32,66	1,18
	3	6,78	4,97	6	17,1	12,95	9	44,86	7,95

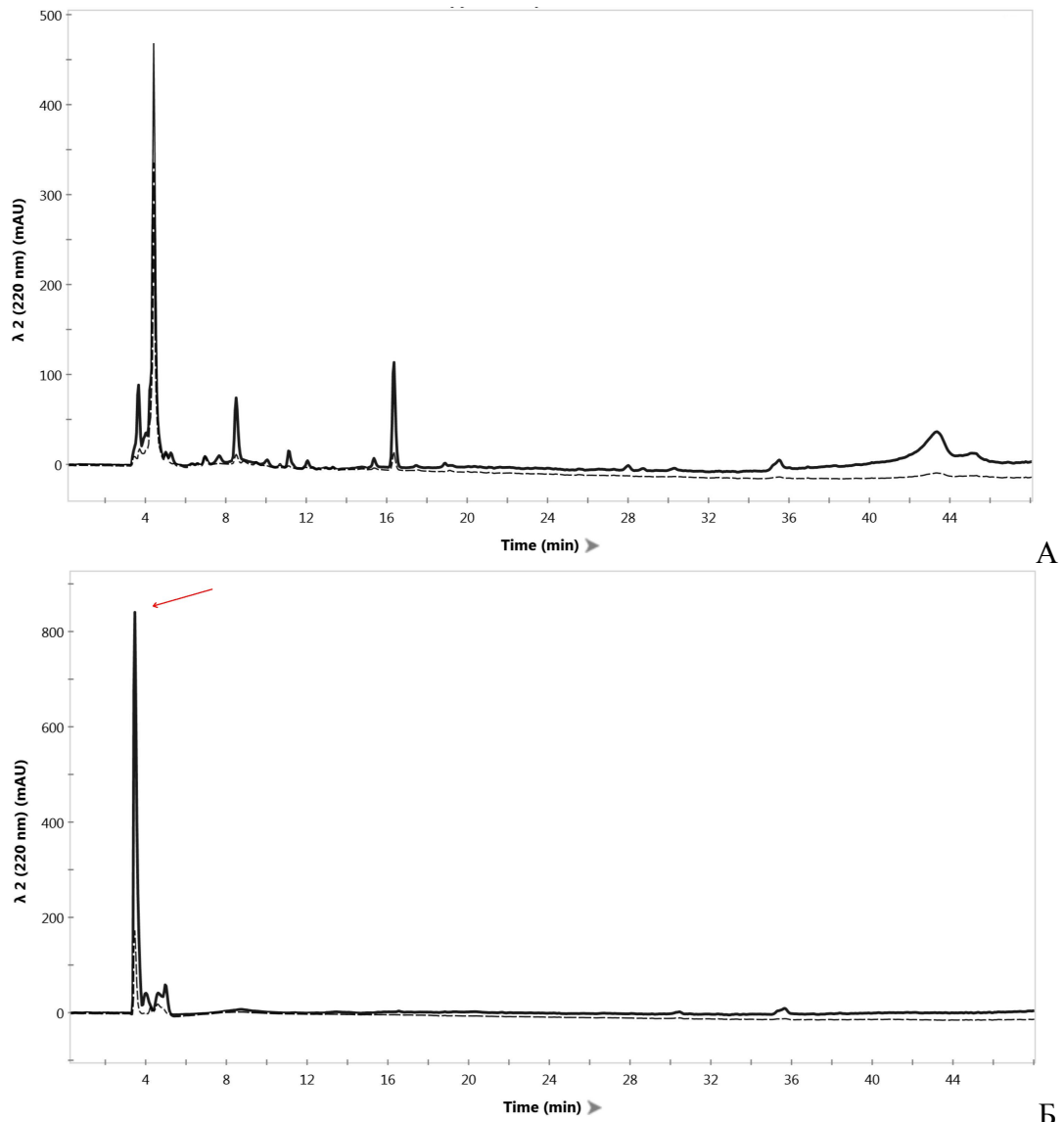


Рисунок 10. Хроматограммы ВЭЖХ-разделения ультрафильтрата (А) и очищенного пептидного раствора (Б) трутневого расплода; штрих — поглощение на длине волны 280 нм, сплошная линия — поглощение на длине волны 220 нм

Таблица 2. Количественные параметры пиков ВЭЖХ-разделения пептидов трутневого расплода

	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %
	А	1	3,65	7,82	4	7,67	1,36	7	12,07	1,3	10	35,52
2		4,41	40,49	5	8,52	8,75	8	15,36	1,15	11	43,35	1,03
3		6,95	1,14	6	11,13	2,34	9	16,35	12,25			
Б	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %
	1	3,45	93,44	4	-	-	7	-	-	10	-	-
	2	4,99	6,56	5	-	-	8	-	-	11	-	-
	3	-	-	6	-	-	9	-	-			

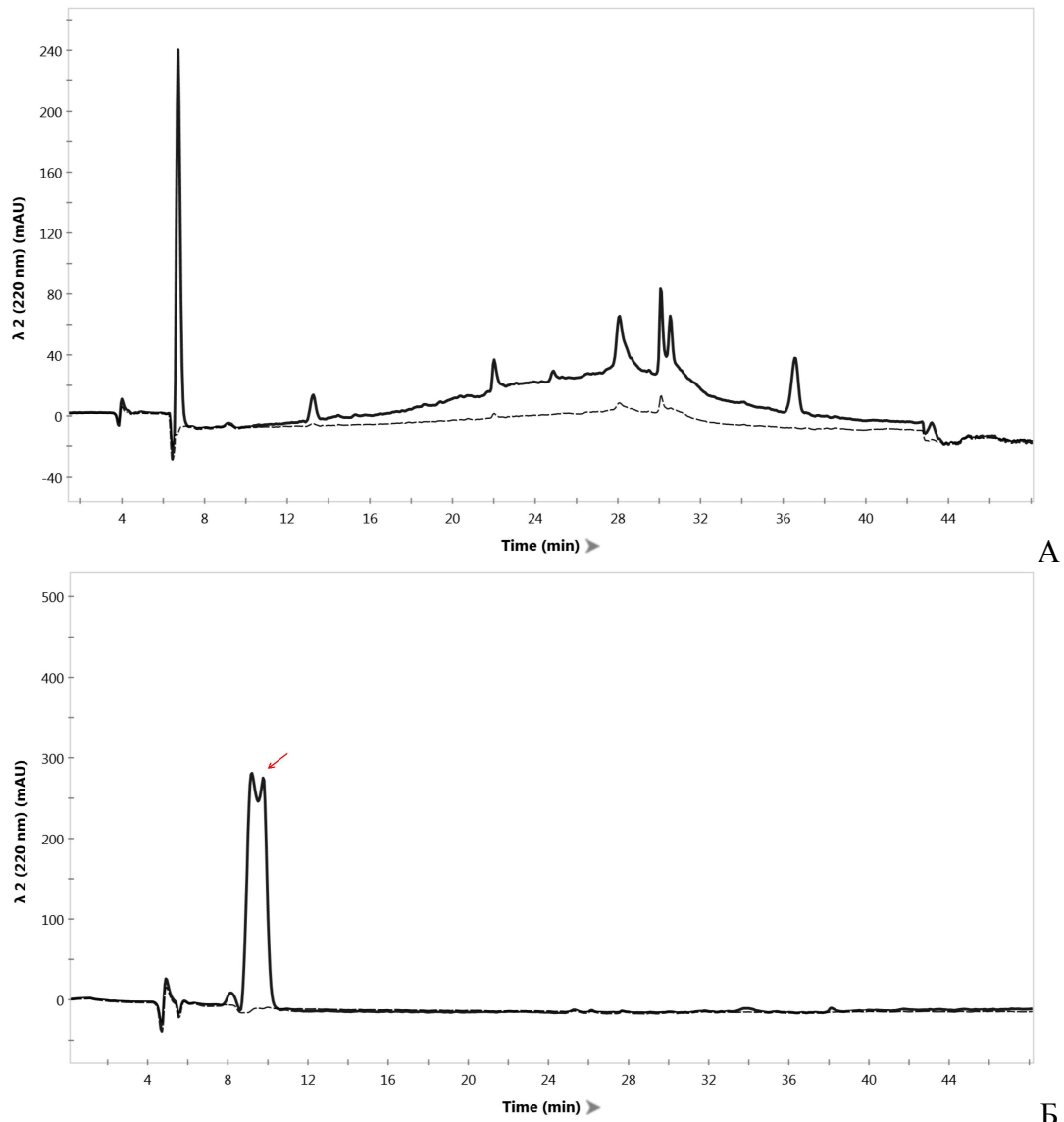


Рисунок 11. Хроматограммы ВЭЖХ-разделения ультрафильтрата (А) и очищенного пептидного раствора (Б) пчелиного мёда; штрих — поглощение на длине волны 280 нм, сплошная линия — поглощение на длине волны 220 нм

Таблица 3. Количественные параметры пиков ВЭЖХ-разделения пептидов пчелиного мёда

	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %
	А	1	4,05	3,16	4	22,13	3,95	7	30,18	6,89	10	43,36
2		7,03	46,65	5	25,3	1,12	8	31,35	4,11			
3		13,1	4,01	6	28,14	15,09	9	36,85	10,84			
Б	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %	№ пика	t_R , мин	S, %
	1	4,91	7,75	4	9,77	37,69	7	-	-	10	-	-
	2	8,16	5,66	5	-	-	8	-	-			
	3	9,19	48,69	6	-	-	9	-	-			

Таким образом, пептидный спектр пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода отличается значительным разнообразием. Данные электрофореза в денатурирующих условиях показывают эффективность метода ультрафильтрации для получения растворов молекул продуктов пчеловодства с необходимой молекулярной массой. Разность в интенсивности поглощения индивидуальных пиков на длинах волн 220 и 280 нм свидетельствует о присутствии в составе выделенных пептидов аминокислот с ароматическими радикалами. Характер сорбции низкомолекулярных пептидов на ДЭАЭ-целлюлозе показывает, что в составе пчелиного мёда и трутневого расплода большая их часть при $\text{pH} = 10$ является катионными.

3.2 Оценка способности низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства влиять на жизнедеятельность микроорганизмов

Результаты определения антибактериальной активности пептидов продуктов пчеловодства в отношении тестовых культур диско-диффузионным методом и минимальной ингибирующей концентрации представлены в табл. 4 и 5.

Для определения антибактериальной активности были использованы два образца пчелиного мёда: гречишный и смешанного ботанического происхождения, т. к. существуют литературные данные, что гречишный мёд обладает относительно повышенным содержанием пероксида водорода [47]. Было установлено, что слабая антибактериальная активность проб пчелиного мёда коррелирует с содержанием H_2O_2 в них: в ультрафильтрате гречишного мёда было $1,57 \pm 0,03$ мг/кг пероксида водорода и полное его отсутствие как в ультрафильтрате смешанного сорта, так и в очищенных пептидных фракциях обоих сортов. Однако из полученных данных следует, что все исследованные образцы не обладают достаточной антибактериальной активностью в соответствии с критериями диско-диффузионного теста.

Отсутствие значимого антибактериального эффекта было также показано и при определении минимальной ингибирующей концентрации. Критерием наличия подавляющего действия пептидов в определённой концентрации было выбрано

отсутствие роста во всех пробах одной повторности. Однако только в случае пептидов маточного молочка в концентрации 50 мкг/мл две из трёх пробы с культурами *S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae* и *E. cloacae* показали угнетение роста культур; в концентрации 20 мкг/мл было угнетение двух проб из трёх только в случае *S. aureus* и одной из трёх в случае *S. pyogenes*; в случае трутневого расплода для пептидов в концентрации 50 мкг/мл угнетение культуры в двух пробах из трёх было продемонстрировано для *S. pyogenes* и в одной из трёх для *S. aureus* и *E. cloacae*; в концентрации 20 мкг/мл в одном случае из трёх против *S. aureus* и *S. pyogenes*.

Таблица 4. Результаты оценки антибактериального эффекта диско-диффузионным методом [16]

Исследуемый образец	Бактериальная культура							
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. cloacae</i>
	Зона задержки роста, мм							
Ультрафильтрат мёда, гречишный	12±1	10±0,75	12±1	8±0,5	н/д			
Пептиды мёда, гречишный	8±1	0	0	0				
Ультрафильтрат мёда, смешанный	10±1	8±1	8±1	10±1				
Пептиды мёда, смешанный	0	0	2±1	0				
Ультрафильтрат трутневого расплода	12±1	12±1	н/д		0	10±1	0	0
Пептиды трутневого расплода	8±1	0			8±1	8±1	0	0
Ультрафильтрат маточного молочка	16±1	8±1			16±1	10±1	8±1	8±1
Пептиды маточного молочка	8±1	8±1			0	8±1	0	0
Примечания: во всех случаях на диск наносили по 5 мкг пептидов; зона задержки роста дисков с цефтриаксоном везде >30 мм								

Таблица 5. Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации растворов пептидов продуктов пчеловодства

Бактериальная культура	Исследуемый образец								
	Пептиды пчелиного мёда			Пептиды маточного молочка			Пептиды трутневого расплода		
	Концентрация, мкг/мл								
	50	20	10	50	20	10	50	20	10
<i>S. aureus</i>	+	+	+	××	××	+	×	×	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i>	+	+	+	××	×	+	××	×	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	××	+	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	+	+	+	××	+	+	×	+	+

Примечания: + — присутствие признаков роста бактериальной культуры; × — отсутствие признаков роста культуры (количество символов = количество проб с ингибированием роста)

Результаты изучения влияния пептидов продуктов пчеловодства на общую дегидрогеназную и каталазную активности показаны на рис. 12 и 13 и в табл. 6.

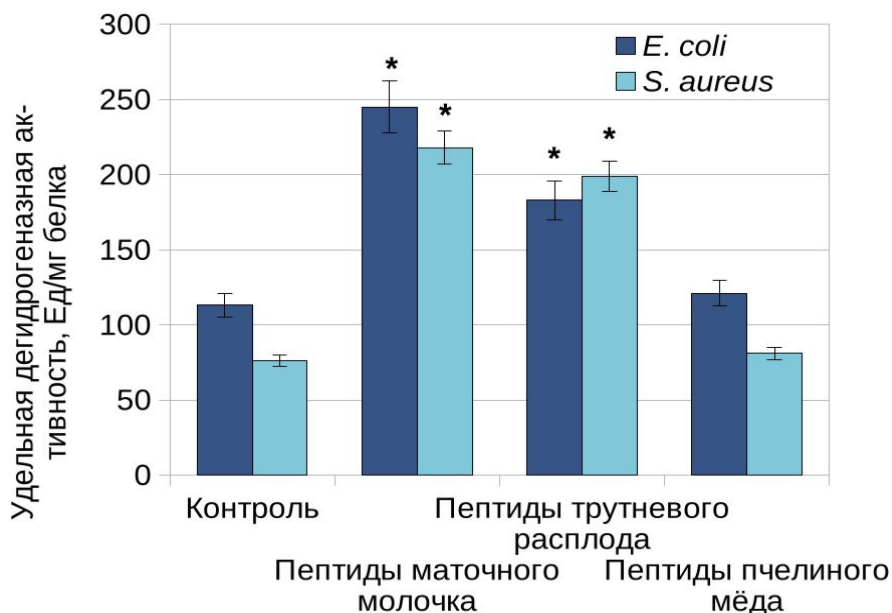


Рисунок 12. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на удельную дегидрогеназную активность штаммов *S. aureus* и *E. coli* (* — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем)

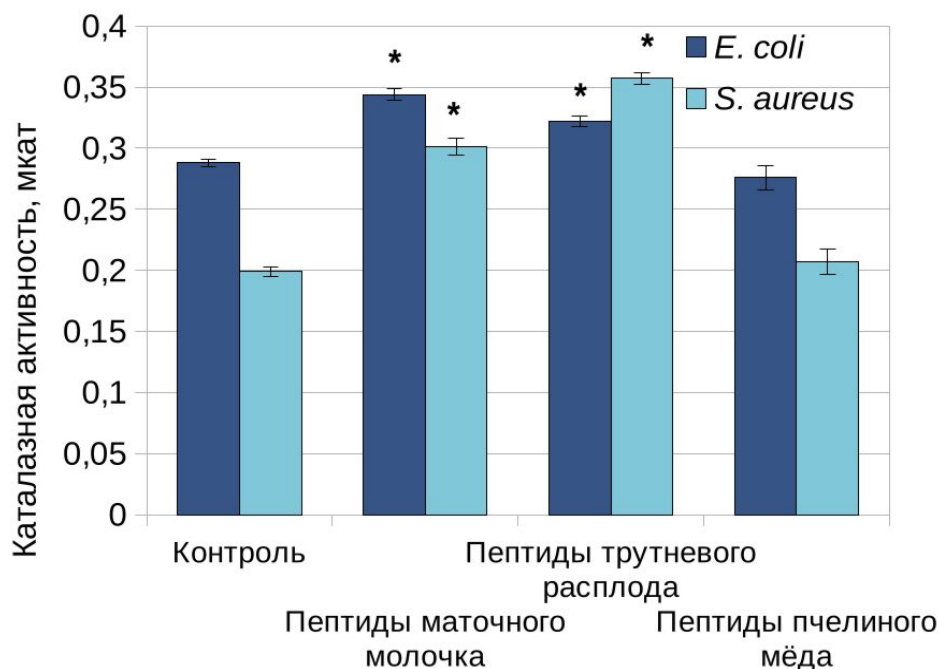


Рисунок 13. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на каталазную активность штаммов *S. aureus* и *E. coli* (* — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем)

Таблица 6. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на каталитическую активность клеток *E. coli* и *S. aureus*

Образец	Культура	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Общая дегидрогеназная активность, Ед/мг белка</i>		
Контроль	113±7,91	76±3,87
Пептиды маточного молочка	245±17,15*	218±10,8*
Пептиды трутневого расплода	183±14,64*	199±11,97*
Пептиды пчелиного мёда	121±7,26	81±4,1
<i>Каталазная активность, мкат</i>		
Контроль	0,288±0,003	0,199±0,004
Пептиды маточного молочка	0,344±0,005*	0,301±0,007*
Пептиды трутневого расплода	0,322±0,004*	0,357±0,005*
Пептиды пчелиного мёда	0,276±0,01	0,207±0,011

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

Было установлено, что пептиды маточного молочка и трутневого расплода статистически достоверно ($p < 0,05$) увеличивают дегидрогеназную активность

клеток *E. coli* по сравнению с контролем на 117% и 62% соответственно и *S. aureus* в 2,87 и 2,62 раза соответственно.

Каталазная активность клеток *E. coli* под действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода по сравнению с контролем статистически достоверно ($p < 0,05$) возрастает на 19% и 12% соответственно, а каталазная активность *S. aureus* увеличивается на 51% и 79% соответственно. Статистически значимого влияния пептидов пчелиного мёда в обоих случаях не зафиксировано.

Полученные результаты свидетельствуют, что антибактериальная активность изученных продуктов пчеловодства не зависит от присутствия в их составе пептидов массой до 5 кДа, а опосредована другими факторами. Присутствие влияния низкомолекулярных пептидов маточного молочка и трутневого расплода на ферментативную активность *E. coli* и *S. aureus* показывает наличие биологической активности данных пептидов.

3.3 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса

3.3.1 Формирование хронического стресса и оценка степени его сформированности

За время моделирования хронического стресса не было зафиксировано уменьшения массы тела животных.

Для оценки уровня сформированности тревожного поведения на 1, 5, 10 и 15-е сутки моделирования животные контрольной группы проходили тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (рис. 14, табл. 7). Было установлено, к 15-му дню формирования стресса время нахождения животных в закрытых рукавах установки по сравнению с тем же параметром для первых суток был увеличен на 9,38%. За аналогичный период время нахождения животных в открытых рукавах установки снизилось на 29,93%, что свидетельствует об увеличенном состоянии тревожности экспериментальных животных.

Параллельно с ходом моделирования хронического стресса животные опытных групп интраназально получали растворы индивидуальных пептидов, выде-

ленных из маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда (пики на рис. 7-9 под номерами 6, 1 и 3 соответственно указаны стрелкой). Выбранные пептидные фракции характеризуются большей относительной площадью пика, соответственно находятся в смеси в наибольшей концентрации.

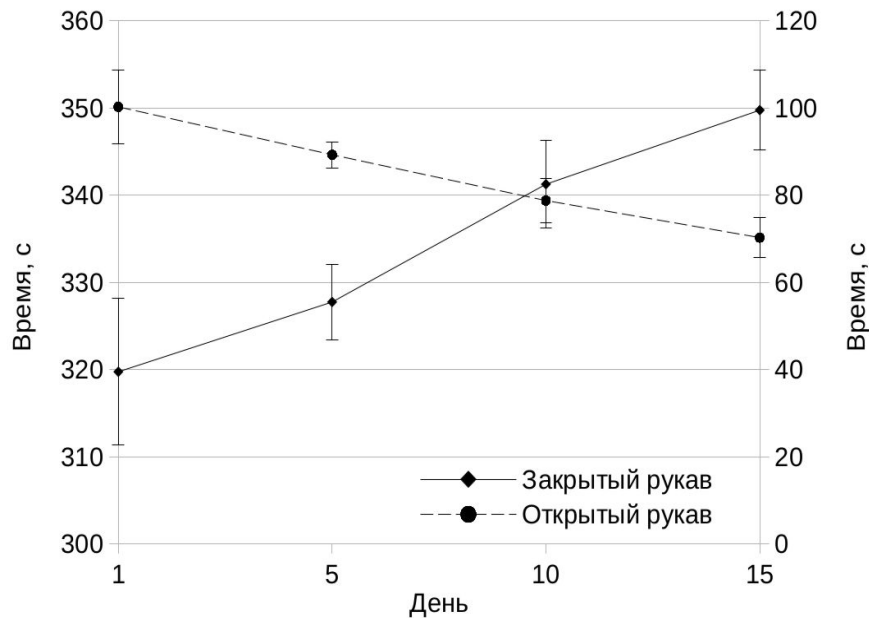
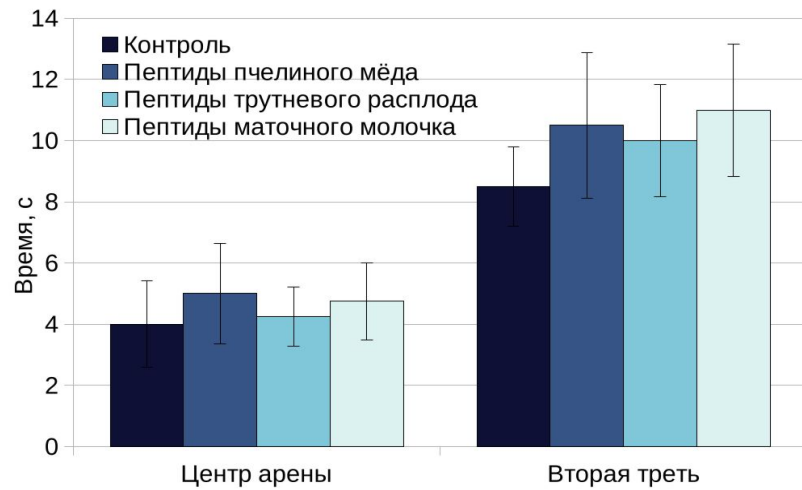
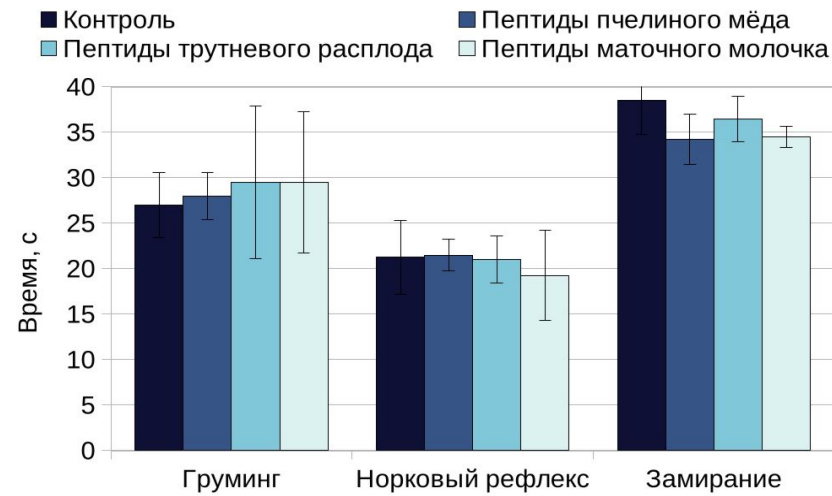


Рисунок 14. Результаты эксперимента по изучению динамики времени нахождения животных контрольной группы в рукавах установки «Приподнятый крестообразный лабиринт» (левая шкала для времени нахождения в закрытом рукаве, правая — открытом)

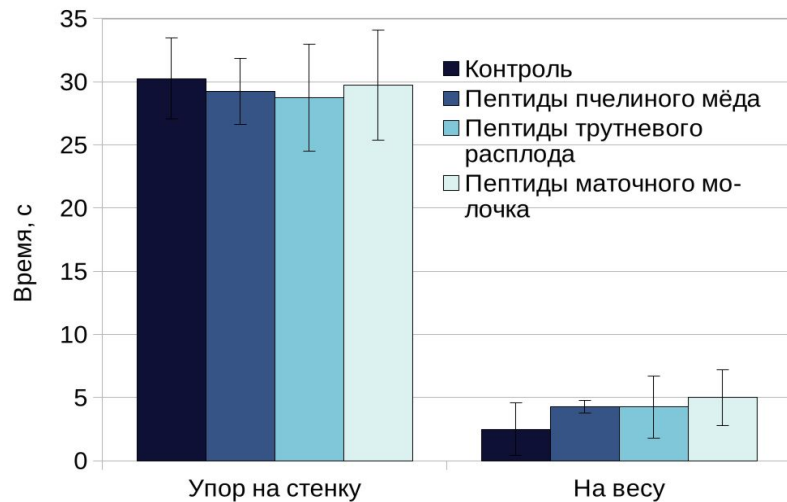
На 15-е сутки животные всех экспериментальных групп прошли тест «Открытое поле». Результаты представлены на рис. 15, 16 и в табл. 8. Было установлено, что интраназальный ввод индивидуальных пептидных фракций маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда в концентрации 100 мкг/кг массы тела не оказывает статистически значимого влияния на поведение животных в условиях хронического стресса. Из результатов следует, что выбранные фракции пептидов не обладают биологической активностью, либо их концентрация мала для её проявления. На основании этого для дальнейших исследований было решено использовать смесь выделенных низкомолекулярных пептидов, и повысить вводимую концентрацию до 300 мкг/кг массы тела. Формирование состояния хронического стресса и введение пептидов было осуществлено с новыми лабораторными животными.



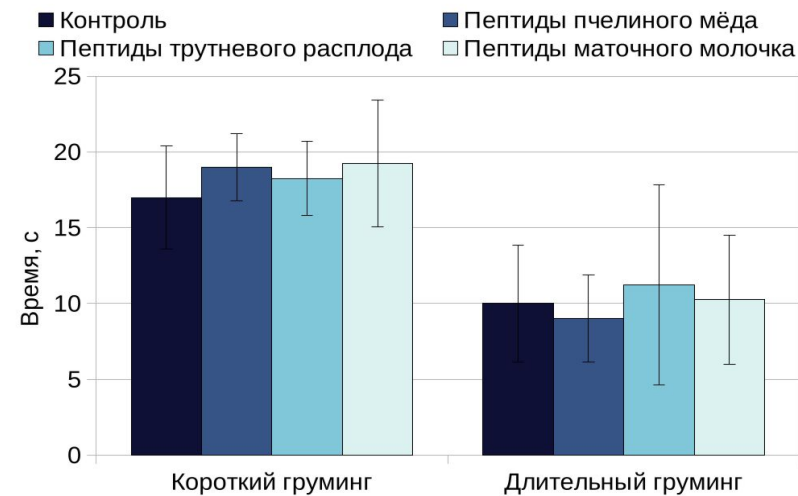
А



А



Б



Б

Рисунок 15. Результаты оценки влияния индивидуальных фракций продуктов пчеловодства на горизонтальную (А) и вертикальную (Б) двигательную активность животных в тесте «Открытое поле»

Рисунок 16. Результаты оценки влияния индивидуальных фракций продуктов пчеловодства на различные формы поведения (А) и распределение времени груминга (Б) животных в тесте «Открытое поле»

Таблица 7. Значения времени нахождения животных в открытых и закрытых рукавах установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Сутки	Время нахождения, с	
	Закрытый рукав	Открытый рукав
1	319,8±8,4	100,3±7,9
5	327,75±4,4	89,25±3
10	341,25±5,1	78,75±5,2
15	349,8±4,6*	70,3±5*

* — $p < 0,05$ по сравнению с началом опыта

Таблица 8. Количественные показатели поведения животных в тесте «Открытое поле» после приёма отдельных пептидов продуктов пчеловодства в концентрации 100 мкг/кг массы тела

Параметр, с	Группа			
	Контроль	Пептиды трутневого расплода	Пептиды маточного молочка	Пептиды пчелиного мёда
Центр арены	4±1,41	4,25±0,96	4,75±1,26	5±1,63
Вторая треть	8,5±1,3	10±1,83	11±2,16	10,5±2,38
Упор на стенку	30,3±2,1	28,8±2,9	29,8±2,5	29,3±2,6
На весу	2,5±2,1	4,3±1,5	5±2,2	4,3±1
Груминг	27±1,6	29,5±3,4	29,5±4,8	28±4,7
Короткий груминг	17±3,56	18,25±2,36	19,25±2,63	19±3,67
Длительный груминг	10±2,16	11,25±2,63	10,25±2,26	9±1,63
Норковый рефлекс	21,3±2,2	21±2,3	19,3±1,5	21,5±2,4
Замирание	38,5±1,7	36,5±2,6	34,5±3,4	34,3±3

3.3.2 Результаты оценки влияния низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства на поведение экспериментальных животных

В соответствии со схемой эксперимента на 15-е сутки после введения пептидов либо 0,9%-го р-ра NaCl животные были подвергнуты первому стрессовому фактору, а во второй половине дня прошли тест «Открытое поле», на 16-е сутки вместо запланированного стрессового воздействия животные прошли тест «Вынужденное плавание», что равноценно по силе аналогичному стрессовому фактору,

применяемому ранее. На 17-е сутки животные приняли участие в первой половине дня в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», а во второй половине — «Тёмная/светлая комната». На 18-е сутки был проведён тест «Предпочтение сахарозы», после чего животные были выведены из эксперимента. В дни проведения поведенческих тестов крысы продолжали получать соответствующие их группам растворы интраназально. Также для оценки степени сформированности хронического стресса после вывода животных из эксперимента в сыворотке крови была определена концентрация АКТГ и кортикостерона.

Результаты по изучению влияния пептидов продуктов пчеловодства на поведение крыс в условиях теста «Открытое поле» приведены на рис. 17-20 и в табл. 9. Было установлено, что пептиды маточного молочка и трутневого расплода при интраназальном введении в концентрации 300 мкг/кг массы тела в условиях хронического стресса влияют на все аспекты поведения экспериментальных животных, фиксируемые в данном тесте, кроме количества актов дефекации, т. к. ни одно животное не оставило болюсов за время тестирования. У животных, получавших пептиды трутневого расплода и маточного молочка статистически достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с контролем было увеличено время нахождения в центре арены в 2,58 и 2,25 раза соответственно, в средней её части в 3,15 и 3,3 раза, а также время вставания на задние лапы с опорой на 38,7% и 50,8% соответственно. Статистически достоверных различий во времени вставания на задние лапы без опоры между группами выявлено не было. Под действием пептидов трутневого расплода и маточного молочка было увеличено время общего груминга ($p < 0,05$) по сравнению с контролем на 81,5% и 62,1% соответственно, а также распределение времени груминга на короткий и длительный. Время короткого — стрессогенного — груминга снизилось по сравнению с контролем на 31,4% и 52,7%, а время длительного — показателя комфорта животного — увеличилось ($p < 0,05$) на 81,6% и 28,2%. Под действием пептидов трутневого расплода и маточного молочка у животных была повышена частота проявления исследовательского поведения: время демонстрации норкового рефлекса у соответствующих групп животных увеличено ($p < 0,05$) по сравнению с контролем на 45% и 60% соответственно.

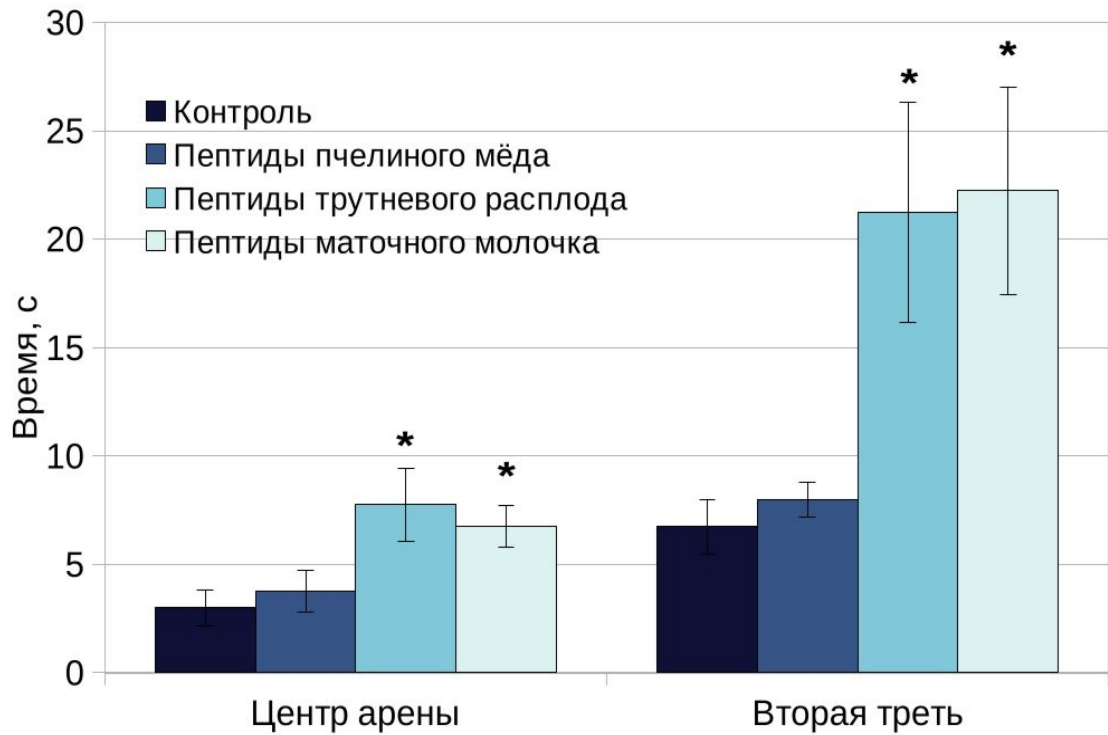


Рисунок 17. Значения горизонтальной двигательной активности при интраназальном введении продуктов пчеловодства. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

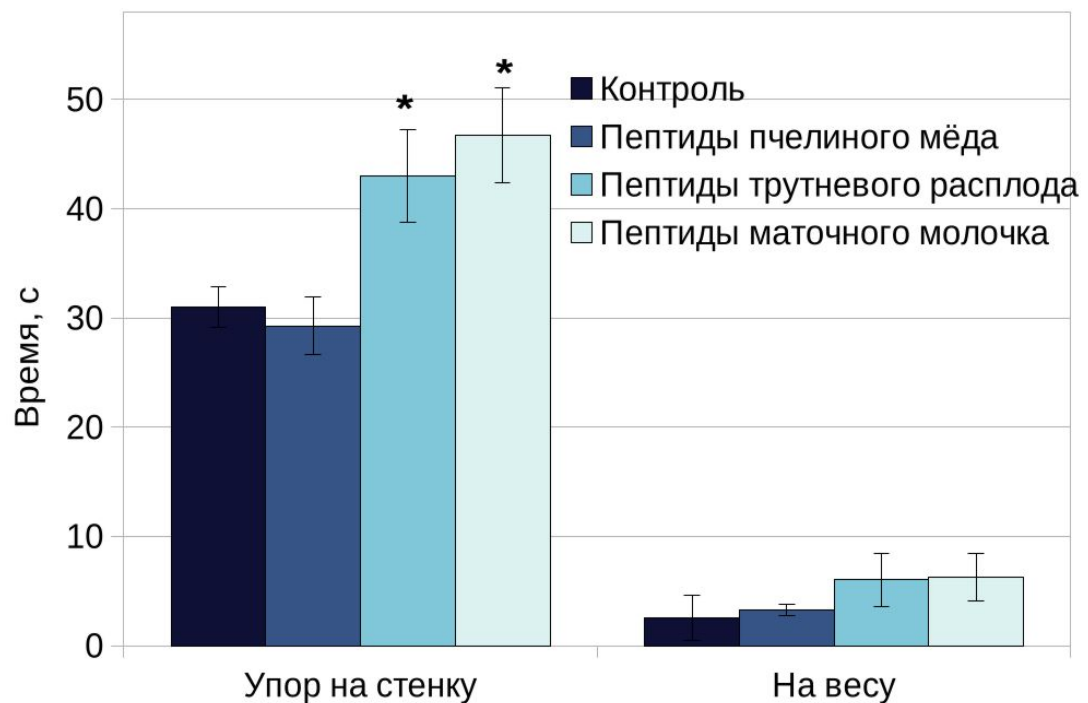


Рисунок 18. Значения вертикальной двигательной активности при интраназальном введении пептидов продуктов пчеловодства. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

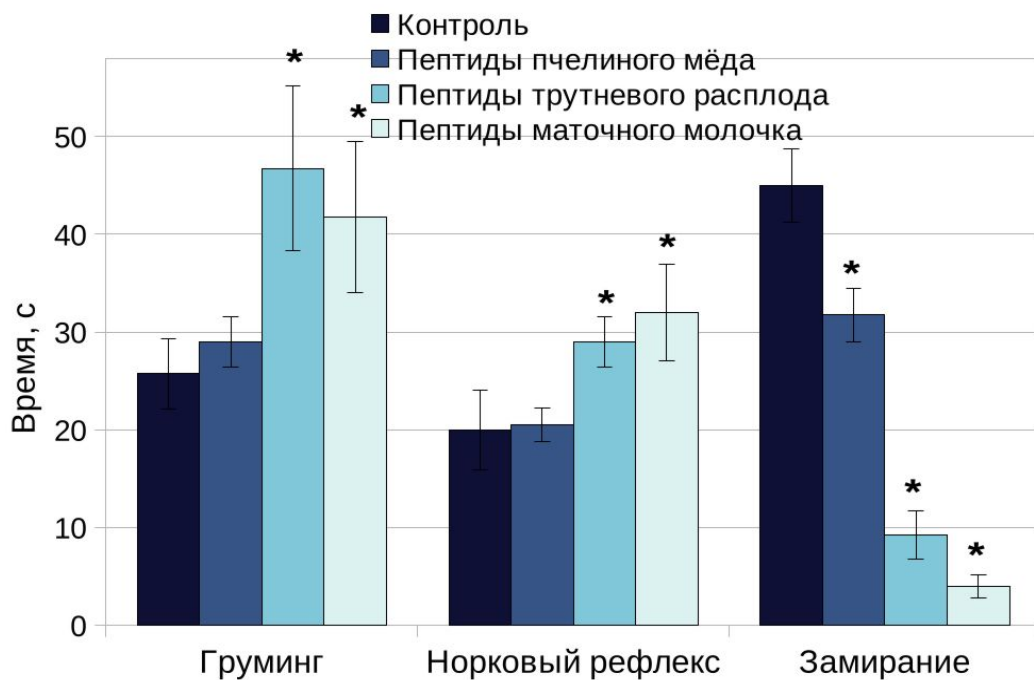


Рисунок 19. Значения исследовательской активности и показатели комфорта крыс: груминг (все акты чистки вне зависимости от вида и длительности), норковый рефлекс (исследование отверстий в полу) и замирание. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

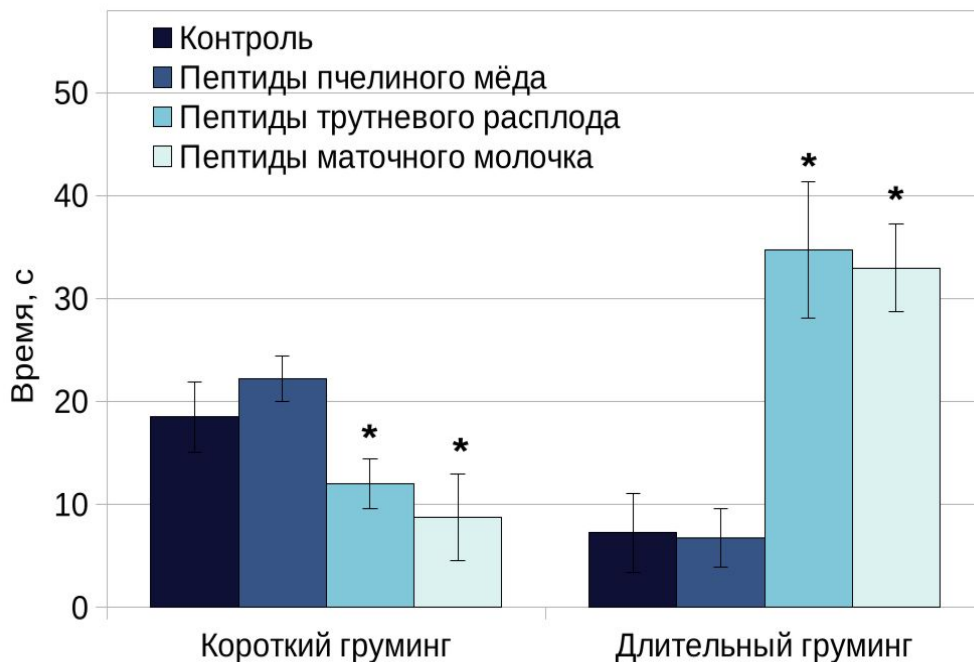


Рисунок 20. Распределение времени груминга на короткий (умывание мордочки и чистка за ушами) и длительный (чистка всего тела). * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Таблица 9. Количественные показатели поведения животных в тесте «Открытое поле» после приёма совокупности очищенных низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства в концентрации 300 мкг/кг массы тела [21]

Параметр, с	Группа			
	Контроль	Пептиды трутневого расплода	Пептиды маточного молочка	Пептиды пчелиного мёда
Центр арены	3±0,82	7,75±1,7*	6,75±0,96*	3,75±0,96
Вторая треть	6,75±1,26	21,25±2,06*	22,25±4,79*	8±0,82
Упор на стенку	31±1,8	43±4,2*	46,8±4,3*	29,3±2,6
На весу	2,5±2,1	6±2,4	6,3±2,2	3,3±0,5
Груминг	25,8±3,6	46,8±8,4*	41,8±7,8*	29±2,6
Короткий груминг	18,5±3,42	12±2,45*	8,75±4,19*	22,25±2,22
Длительный груминг	7,25±3,86	34,75±6,6*	33±4,24*	6,75±2,87
Норковый рефлекс	20±4,1	29±2,6*	32±5*	20,5±1,7
Замирание	45±3,7	9,3±2,5*	4±1,2*	31,8±2,8

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

Значительно ($p < 0,05$) было снижено время замирания у животных, получавших пептиды трутневого расплода и маточного молочка — на 79,44% и 91,1% соответственно.

Результаты измерения времени активного плавания в условиях теста «Вынужденное плавание» при хроническом стрессе представлены на рис. 21. Было установлено, что у животных, которые получали пептиды трутневого расплода и маточного молочка, время активного плавания достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с контролем ($137 \pm 12,6$ с) увеличено на 101,1% и 73,2% соответственно ($275,5 \pm 55,2$ с и $237,25 \pm 30,3$ с), что свидетельствует о снижении уровня тревоги у крыс данных групп.

На рис. 22, 23 и в табл. 10 представлены результаты изучения поведения животных в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях хронического стресса. Было установлено, что статистически достоверно по сравнению с контролем у животных, получавших пептиды маточного молочка и трутневого

расплода, изменяется только время нахождения в различных частях опытной установки, в то время как показатели двигательной активности не меняются ($p > 0,05$).

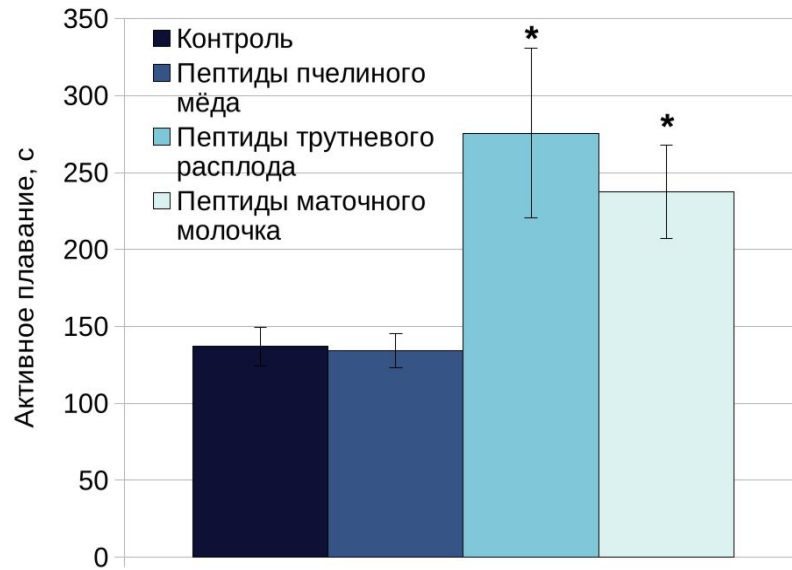


Рисунок 21. Значения времени активного плавания при хроническом стрессе. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Так, время нахождения крыс в закрытых рукавах снизилось на 32% и 28,6% соответственно, а в открытых повысилось в 2,1 и 2,08 раза. Также увеличилось время нахождения на центральной площадке на 118,75% и 82,1% соответственно.

Таблица 10. Количественные показатели поведения животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Параметр	Группа			
	Контроль	Пептиды трутневого расплода	Пептиды маточного молочка	Пептиды пчелиного мёда
Закрытый рукав, с	327±13	222,25±10,88*	233,5±3,42*	319±7,87
Открытый рукав, с	65±12,52	136,5±5,07*	135,5±5,06*	71,75±6,08
Центр, с	28±1,83	61,25±8,8*	51±3,56*	29,25±2,22
Свешивания, с	7,25±2,06	10,6±1,83	10,5±1	6±0,82
Переход в открытый рукав, раз	5,25±1,26	7,25±1,24	8±1,63	6,25±1,7
Переход в закрытый рукав, раз	6,25±1,5	5,25±2,22	9±2,16	6,25±1,89

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

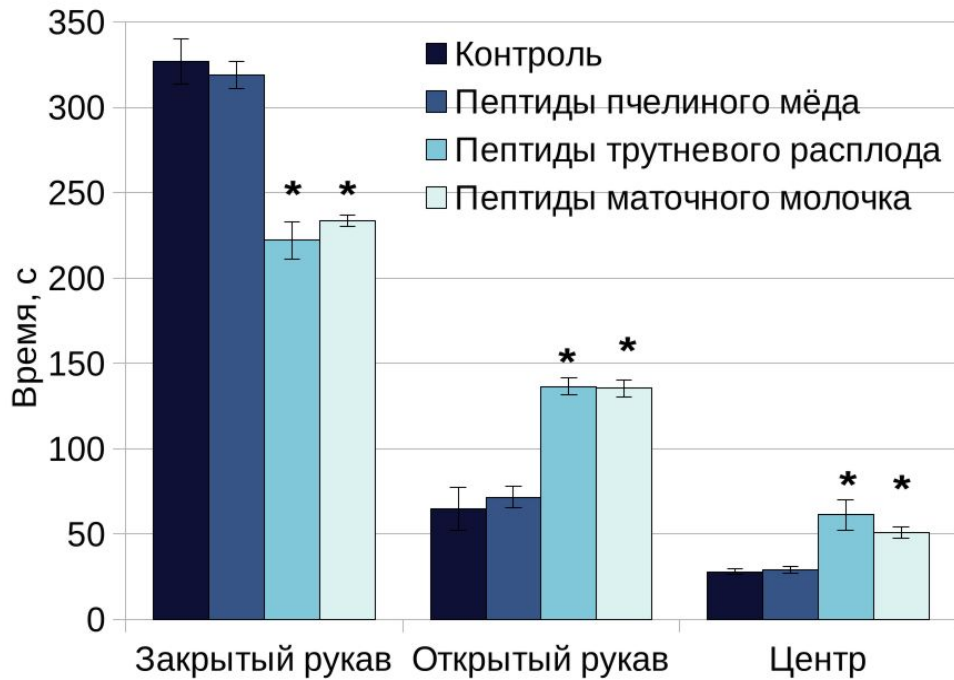


Рисунок 22. Значения времени нахождения животных в различных частях опытной установки «Приподнятый крестообразный лабиринт». * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

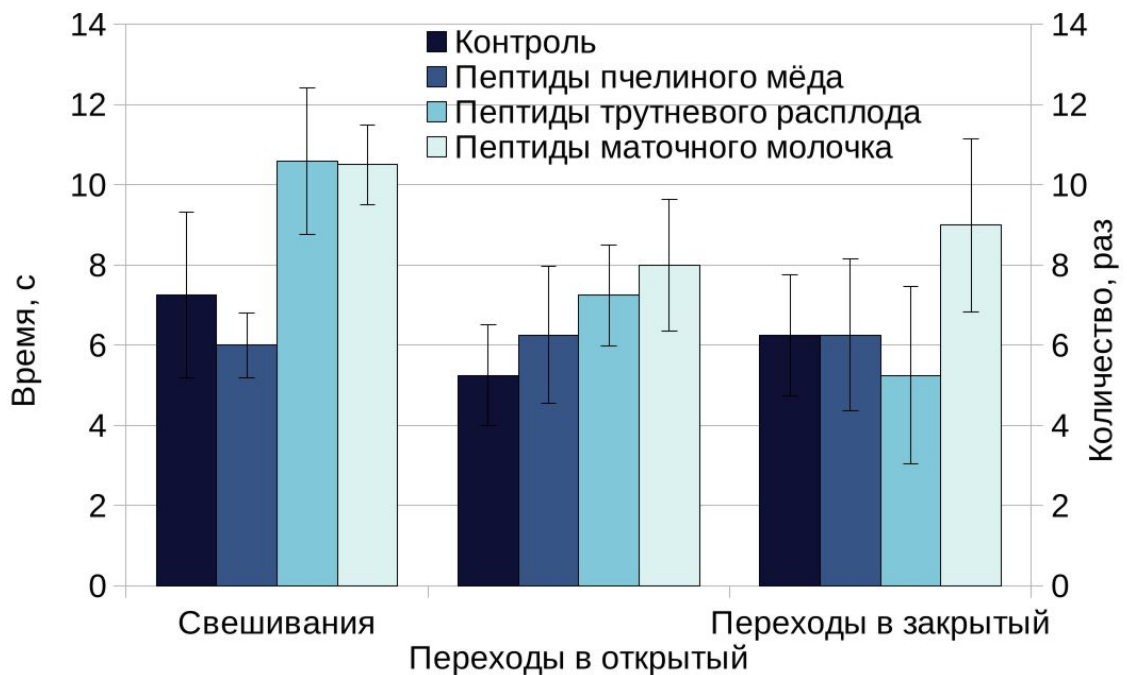


Рисунок 23. Параметры двигательной активности экспериментальных животных в опыте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: «свешивания» — время, проведённое за актами свешивания с открытых рукавов и центральной площадки (шкала слева), «переходы в открытый» и «переходы в закрытый» — количество переходов в соответствующие рукава с центральной площадки; достоверность среди всех сравниваемых значений

$p > 0,05$

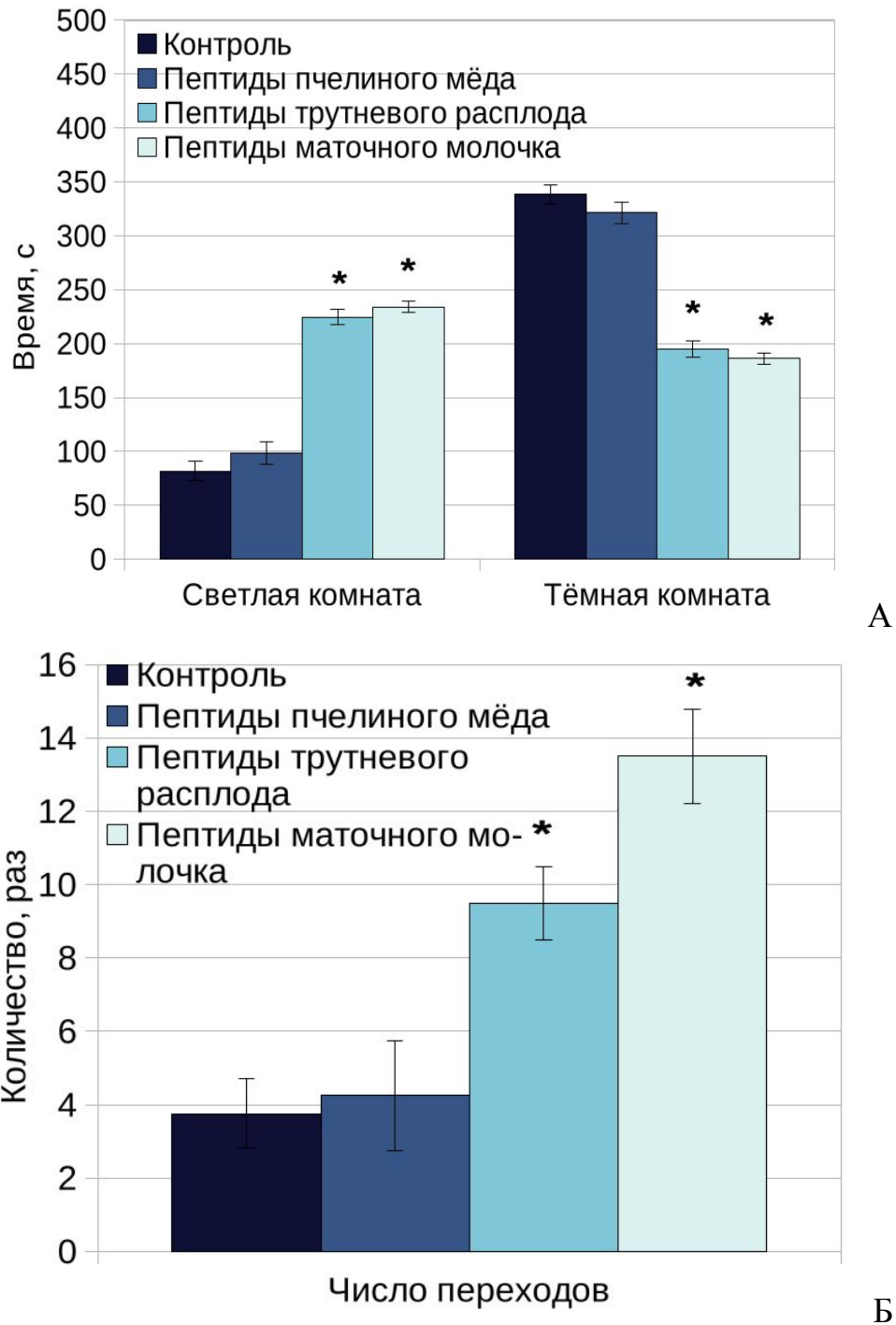


Рисунок 24. Показатели поведения экспериментальных животных в условиях теста «Тёмная/светлая комната»: А) — распределение времени нахождения в тёмной и освещённой частях установки; Б) — количество переходов животных через перегородку между тёмной и освещёнными частями установки. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Результаты измерения параметров поведения экспериментальных животных в тесте «Тёмная/светлая комната» представлены на рис. 24. Было установлено, что животные, получавшие пептиды личинок трутневого расплода и маточного молочка,

ка, статистически достоверно ($p < 0,05$) в 2,75 и 2,86 раза больше времени ($224,75 \pm 7,5$ с и $234 \pm 5,4$ с соответственно) проводили в освещённой части установки, чем животные контрольной группы ($81,75 \pm 9$ с). Статистически достоверно увеличено было также и среднее количество переходов между отсеками в 2,53 раза для животных, получавших пептиды личинок трутневого расплода, и в 3,6 раза для животных, получавших пептиды маточного молочка ($9,5 \pm 1$ раз и $13,5 \pm 1,3$ раза соответственно; контроль — $3,75 \pm 1$ раза).

Результаты теста «Предпочтение сахарозы» представлены на рис. 25. В ходе этого теста было установлено, что животные, получавшие пептиды личинок трутневого расплода и маточного молочка увеличили долю потреблённого раствора сахарозы в ходе эксперимента в среднем до $82,68 \pm 3,3\%$ и $86,15 \pm 2,7\%$ соответственно, в то время как доля потреблённого раствора сахарозы для животных контрольной группы составила в среднем $19,2 \pm 2,1\%$ [18].

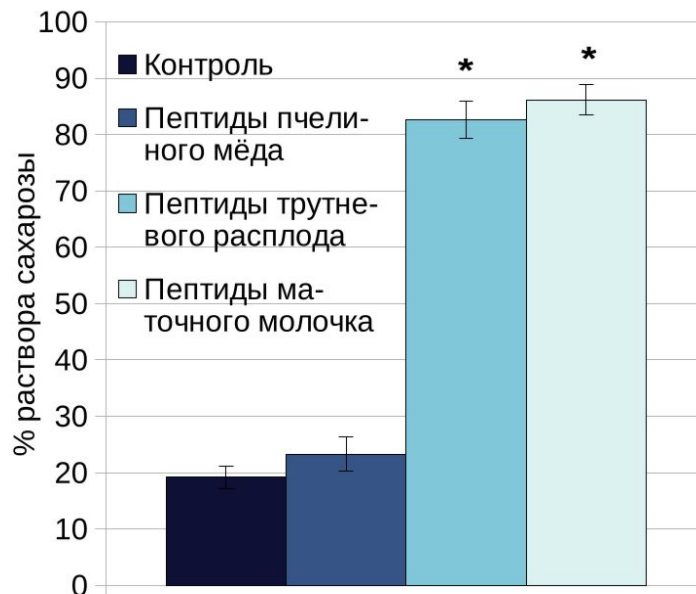


Рисунок 25. Показатели доли потреблённого раствора сахарозы в процентах от общего объёма выпитой жидкости за тестовый период. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

После проведения физиолого-фармакологических тестов животные всех групп были выведены из эксперимента путём декапитации. Дополнительно, как для оценки степени сформированности состояния хронического стресса, так и для

изучения влияния низкомолекулярных пептидов (до 5 кДа) из продуктов пчеловодства, в сыворотке крови была определена концентрация АКТГ и кортикостерона методом ИФА. Результаты измерений представлены на рис. 26 и 27.

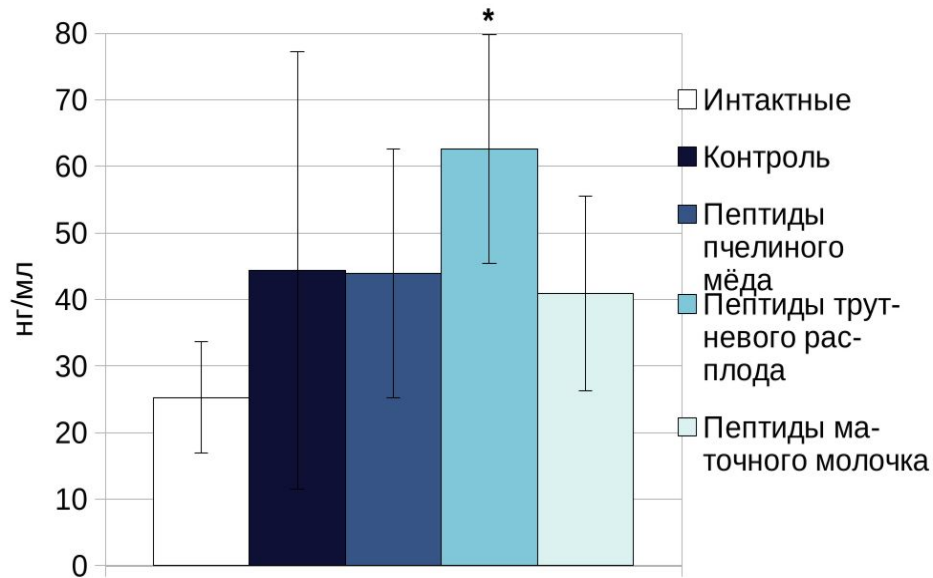


Рисунок 26. Концентрации адренокортикотропного гормона в сыворотке крови крыс, получавших пептиды продуктов пчеловодства в условиях хронического стресса (* — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с интактными)

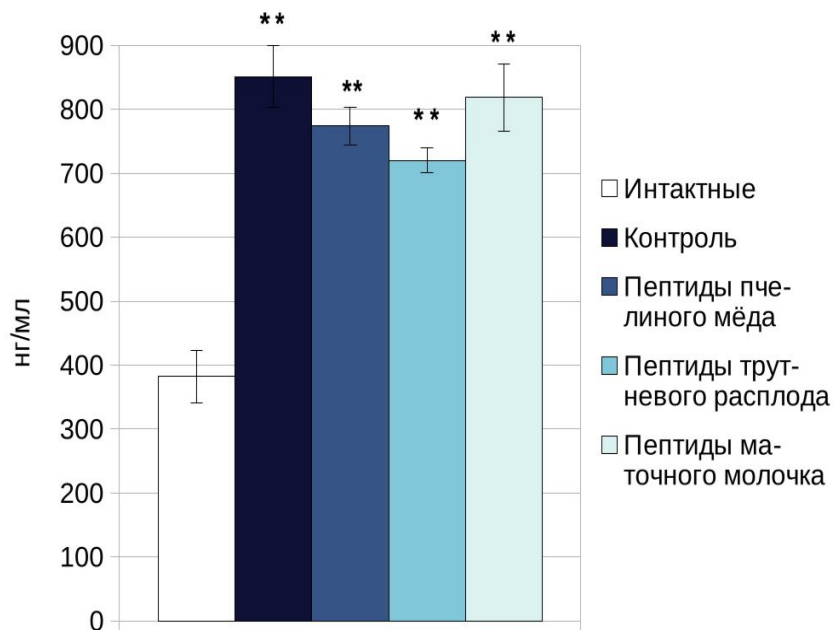


Рисунок 27. Концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс, получавших пептиды продуктов пчеловодства в условиях хронического стресса. ** — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с интактными животными

Статистически достоверное увеличение концентрации кортикостерона в сыворотке крови у животных, подвергнутых хроническому стрессу, по сравнению с

интактными свидетельствует о его сформированности. Концентрация кортикостерона у интактных крыс составила $382,5 \pm 40,9$ нг/мл, у крыс контрольной группы — $851,25 \pm 48,2$ нг/мл. Концентрация кортикостерона животных, получавших пептиды пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода составила $773,75 \pm 29,6$ нг/мл, $818,75 \pm 52,7$ нг/мл и $720 \pm 19,6$ нг/мл соответственно.

Значимое изменение в уровне АКТГ зафиксировано было только для животных, получавших пептиды трутневого расплода. Так, у животных интактной группы концентрация АКТГ составила $25,25 \pm 8,35$ нг/мл, а у контрольных и получавших пептиды пчелопродуктов $44,36 \pm 32,8$ нг/мл, $43,94 \pm 18,7$ нг/мл, $62,57 \pm 17,15$ нг/мл и $40,94 \pm 14,62$ нг/мл соответственно.

Достоверных изменений в концентрации АКТГ и кортикостерона между животными опытных и контрольной групп зафиксировано не было.

Во всех проведённых физиолого-фармакологических тестах не было зафиксировано статистически значимых различий между измеряемыми параметрами животных контрольной группы и группы, получавшей пептиды, выделенные из пчелиного мёда.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности выделенных низкомолекулярных пептидов маточного молочка и трутневого расплода в концентрации 300 мкг/кг массы тела влиять на поведение самцов крыс линии Wistar в условиях хронического стресса при постоянном интраназальном введении.

3.4 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на активность ферментов процессинга нейропептидов

После вывода крыс из эксперимента, мозг животных был разделён на отделы (гипофиз, гипоталамус, стриатум, гиппокамп, амигдала, четверохолмие, продолговатый мозг), гомогенаты которых вместе с надпочечниками и сывороткой крови были использованы для определения влияния интраназального ввода пептидов, выделенных из продуктов пчеловодства, на активность карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A.

Результаты по измерению активности карбоксипептидазы E у экспериментальных животных представлены на рис. 28 и в табл. 11. Было установлено, что, пептиды личинок трутневого расплода и маточного молочка статистически достоверно ($p < 0,05$) изменяют активность КПЕ следующим образом:

- в гипофизе активность **снижается** на 60% и 70% соответственно по отношению к животным контрольной группы;
- в гипоталамусе активность **повышается** на 94% и 172% соответственно;
- в стриатуме активность **повышается** на 86% и 114% соответственно;
- в гиппокампе активность **повышается** в 2,16 и 2,89 раза соответственно;
- в амигдале активность **снижается** на 53% и 44% соответственно;
- в четверохолмии активность **повышается** на 96% и 54% соответственно;
- в продолговатом мозге активность **снижается** на 37% и 44% соответственно.

Статистически достоверных различий в изменении активности КПЕ в надпочечниках установлено не было. Во всех исследованных образцах пептиды, выделенные из пчелиного мёда, не оказали влияния на активность данного фермента.

Результаты измерения ферментативной активности ПДПА в различных отделах мозга и сыворотке крови крыс представлены на рис. 29 и в табл. 11. Выявлено, что пептиды личинок трутневого расплода и маточного молочка статистически достоверно ($p < 0,05$) **снижают** активность данного фермента по сравнению с животными контрольной группы в следующих образцах:

- в гипофизе на 46% и 54% соответственно;
- в гипоталамусе на 37% и 44% соответственно;
- в стриатуме на 37% и 40% соответственно;
- в амигдале на 53% и 56% соответственно;
- в четверохолмии на 57% и 54% соответственно;
- в продолговатом мозге на 40% и 45% соответственно.

Статистически значимого влияния на активность ПДПА в гиппокампе и сыворотке крови со стороны пептидов, выделенных из маточного молочка и личинок

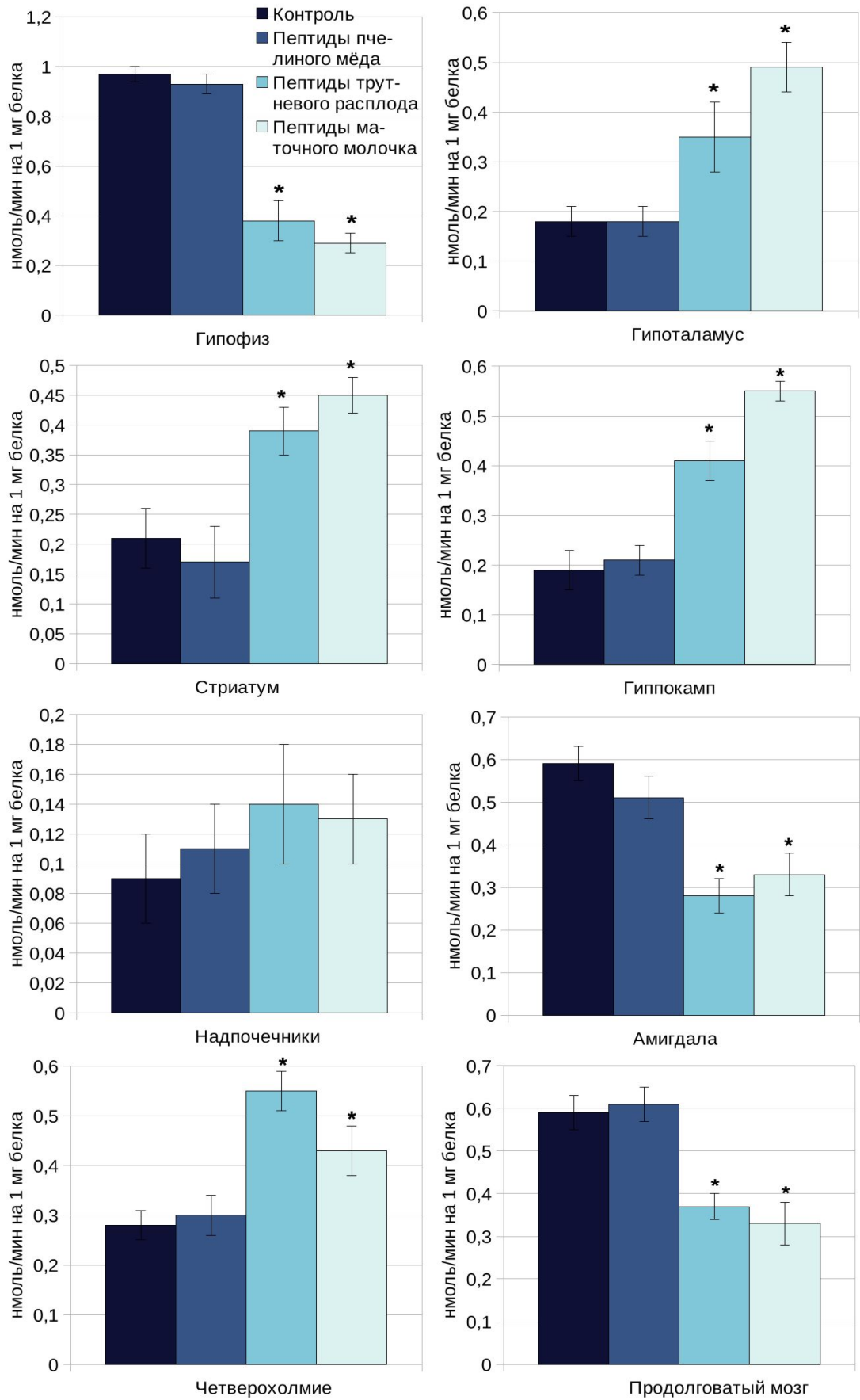


Рисунок 28. Показатели активности карбоксипептидазы E в надпочечниках и отделах мозга. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

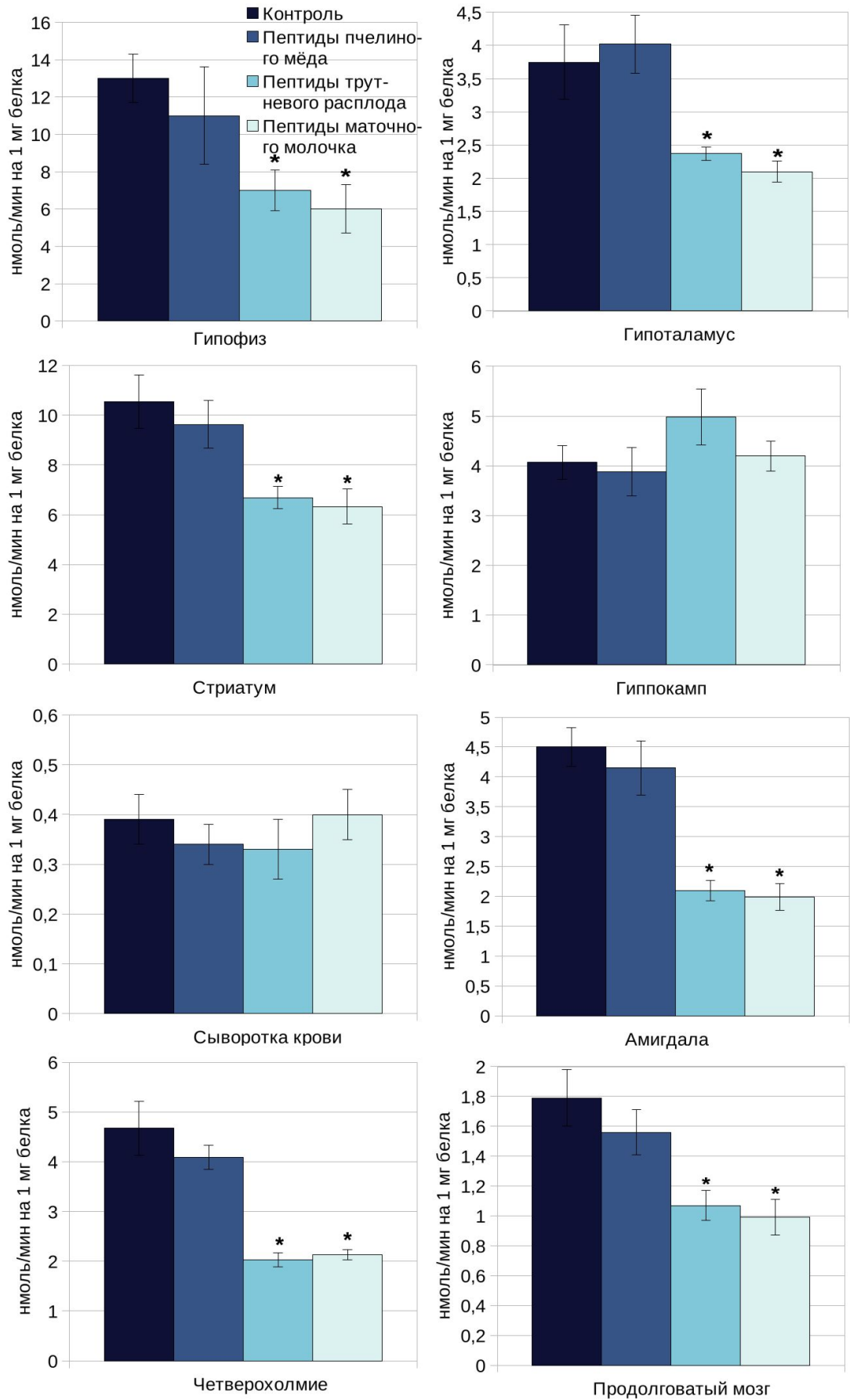


Рисунок 29. Показатели ферментативной активности ПДПА в сыворотке крови и отделах мозга. * — значения достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

трутневого расплода, не выявлено. Пептиды пчелиного мёда также не повлияли на активность фермента во всех изученных отделах мозга и сыворотке крови.

Таблица 11. Значения активности КПЕ и ПДПА в нервной ткани, надпочечниках и сыворотке крови [20, 22]

Образец	Группа животных			
	Контроль	Пептиды трутневого расплода	Пептиды маточного молочка	Пептиды пчелиного мёда
Карбоксипептидаза E, нмоль/мин на 1 мг белка				
Гипофиз	0,97±0,03	0,38±0,08*	0,29±0,04*	0,93±0,04
Гипоталамус	0,18±0,03	0,35±0,07*	0,49±0,05*	0,18±0,03
Стриатум	0,21±0,05	0,39±0,04*	0,45±0,03*	0,17±0,06
Гиппокамп	0,19±0,04	0,41±0,04*	0,55±0,02*	0,21±0,03
Амигдала	0,59±0,04	0,28±0,04*	0,33±0,05*	0,51±0,05
Четверохолмие	0,28±0,03	0,55±0,04*	0,43±0,05*	0,3±0,04
Продолговатый мозг	0,59±0,04	0,37±0,03*	0,33±0,05*	0,61±0,04
Надпочечники	0,09±0,03	0,14±0,04	0,13±0,03	0,11±0,03
Пептидил-дипептидаза A, нмоль/мин на 1 мг белка				
Гипофиз	13±1,3	7±1,1*	6±1,3*	11±2,6
Гипоталамус	3,75±0,56	2,37±0,1*	2,1±0,16*	4,02±0,44
Стриатум	10,54±1,07	6,69±0,45*	6,33±0,7*	9,63±0,95
Гиппокамп	4,07±0,34	4,98±,56	4,2±0,3	3,88±0,49
Амигдала	4,5±0,33	2,1±0,17*	1,99±0,22*	4,15±0,45
Четверохолмие	4,67±0,54	2,03±0,14*	2,13±0,1*	4,09±0,24
Продолговатый мозг	1,79±0,19	1,07±0,1*	0,99±0,12*	1,56±0,15
Сыворотка крови	0,39±0,05	0,33±0,06	0,4±0,05	0,34±0,04

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

Также была проведена оценка влияния пептидов на активность КПЕ и ПДПА в условиях *in vitro* путём добавления к гомогенату гипофиза интактных животных: в контрольные пробы — дистиллированной воды, в опытные пробы — равный объём растворов пептидов маточного молочка и трутневого расплода до

конечной концентрации в 300 мкг/мл (табл. 12). Установлено, что активность КПЕ и ПДПА статистически не изменяется под действием применённых пептидов в условиях *in vitro*.

Таблица 12. Значения активностей КПЕ и ПДПА при добавлении пептидов маточного молочка и трутневого расплода *in vitro*

Фермент	Образец		
	Контроль	Пептиды маточного молочка	Пептиды личинок трутневого расплода
	Активность, нмоль/мин на 1 мг белка		
Карбоксипептидаза E	0,95±0,06	0,93±0,05	0,96±0,07
Пептидил-дипептидаза A	12,1±0,6	13±0,91	11,35±1,14

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

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Пептидный спектр продуктов пчеловодства

Особенности химического состава продуктов пчеловодства затрудняют процесс выделения индивидуальных пептидов из них. В пчелином мёде высокая концентрация углеводов и низкая белковых веществ, в составе имеются фенольные соединения. Практически таким же компонентном составом обладает маточное молочко. В личинках трутневого расплода содержание пептидов мало за счёт клеточного строения (большинство биологически активных пептидов не накапливаются, а синтезируются в малых количествах и утилизируются после оказания эффекта). Вследствие этого классические методы пробоподготовки и выделения (твёрдофазная экстракция, преципитация ТХУ, ацетоном, этанолом, фильтрация, ультрафильтрация, гель-фильтрация) не позволяют быстро и с высокой степенью очистки выделить низкомолекулярные пептиды из продуктов пчеловодства.

В результате выполнения одной из задач данной работы был разработан способ выделения низкомолекулярных пептидов, заключающийся в комбинации методов тангенциальной ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. К преимуществам предложенного способа выделения пептидов можно отнести возможность масштабирования и автоматизации.

Полученные экспериментальные данные также позволяют качественно охарактеризовать спектр пептидных соединений, имеющих в составе маточного молочка, пчелиного мёда и трутневого расплода. Анализ хроматограмм позволяет заключить, что:

1. В маточном молочке удалось установить присутствие 9 различных групп низкомолекулярных пептидов (массой менее 5 кДа), в том числе содержащих аминокислоты с ароматическими радикалами, т. к. некоторые пики имеют поглощение и на длине волны 220 нм, и на 280 нм. Характер распределения времён удерживания показывает, что большинство идентифицированных групп пептидов являются преимущественно полярными, т. к. элюируются до концентрации ацетонитрила в элюенте в 40%.
2. В гомогенате трутневого расплода установлено присутствие 11 групп пепти-

дов, часть из которых также имеет в своём составе ароматические аминокислоты. Распределение времени удерживания пиков на хроматограмме свидетельствует о том, что большинство выделенных пептидов гидрофильны, т. к. они выходят с колонки при концентрации ацетонитрила в элюенте менее 40%.

3. В пчелином мёде удалось идентифицировать 10 индивидуальных групп пептидов, а распределение по гидрофобности-гидрофильности характеризуется равномерностью расположения практически на протяжении всего градиента смеси элюента вода/ацетонитрил.
4. Большинство пептидов маточного молочка при $pH = 10$ заряжены отрицательно, т. к. после ионообменной хроматографии в смеси идентифицируется 7 из 9 групп пептидов. В то же время обратная ситуация наблюдается в случае пептидов трутневого расплода и пчелиного мёда: большинство выделенных пептидов не задерживается на ДЭАЭ-целлюлозе и выходит в свободном объёме колонки.

4.2 Способность низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства влиять на жизнедеятельность микроорганизмов

Большинство исследований в области изучения биологической активности белков и пептидов, выделенных из пчелиного мёда, маточного молочка и гомогената трутневого расплода, фокусируются на их антибактериальном действии, однако в нативных продуктах пчеловодства содержание пептидов крайне мало. Активно исследуются антибактериальные свойства небелковых компонентов этих продуктов, преимущественно пчелиного мёда [17]. Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что антибактериальный эффект нативных продуктов пчеловодства или различных их смесей является следствием множества факторов. Присутствие АМР в их составе не является определяющим. С повышением степени очистки совокупности низкомолекулярных пептидов снижается также и антибактериальная активность исследованных растворов от сомнительной до её полного отсутствия.

Сомнительные значения антибактериальной активности в диско-диффузионном тесте и при определении минимальной ингибирующей концентрации для соответствующих ультрафильтрованных растворов можно объяснить присутствием антимикробных пептидов в составе исходных растворов. Например, в составе пчелиного мёда содержится дефензин-1 (5532 Да) [241]. Однако в силу сравнительно малой концентрации пептидов и их способа выделения и очистки в рамках данного исследования влияние этого антимикробного пептида можно исключить. Снижение антибактериальной активности растворов пептидов трутневого расплода свидетельствует, что несомненно присутствующие в развивающейся личинке трутней антимикробные пептиды в условиях данного эксперимента не остаются в очищенных фракциях.

Изучение влияния полученных пептидов продуктов пчеловодства на ферментативную активность *S. aureus* и *E. coli* чётко показывает, что даже при отсутствии антибактериального эффекта, пептиды оказывают влияние на метаболизм бактерий. Уровень общей дегидрогеназной и каталазной активности является важным показателем напряжённости процессов энергетического и пластического обмена внутри бактериальной клетки. Различные дегидрогеназы играют ключевую роль в субстратном фосфорилировании, процессах биосинтеза первичных и вторичных метаболитов. Так как *E. coli* и *S. aureus* являются факультативными анаэробами, увеличение каталазной активности говорит об усилении окислительного стресса, вызванного ускорением синтетических процессов внутри бактериальной клетки как ответ на внешние стрессовые факторы. Ускорение продукции АТФ за счёт увеличения скорости работы дыхательной цепи ведёт к повышенному образованию АФК, часть из которых ферментами антиоксидантной системы конвертируется в пероксид водорода, разлагаемый каталазой [2, 87]. Повышение активности данных ферментов говорит о напряжении метаболических процессов в бактериальной клетке, вызванном пептидами маточного молочка и трутневого расплода.

Таким образом, полученные нами данные об отсутствии антибактериального эффекта у пептидов продуктов пчеловодства свидетельствуют в пользу теории их многофакторного антибактериального действия. В соответствии с ней антибак-

териальный эффект нативных продуктов пчеловодства или их водных растворов является суммой антибактериального действия ряда факторов, такие как концентрация органических кислот, фенольных соединений, пероксида водорода, а также их особые физико-химические свойства.

4.3 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на поведение крыс в условиях хронического стресса

Анализ совокупности полученных результатов физиолого-фармакологических тестов позволяет сказать, что в условиях хронического стресса длительное (более 15 суток) интраназальное введение очищенных пептидов маточного молочка и трутневого расплода в концентрации 300 мкг/кг массы тела снижает выраженность тревожного поведения самцов линии Wistar. Это выражается в следующем:

I. В тесте «Открытое поле» повышается вертикальная и горизонтальная двигательная активность крыс. При повышенном уровне тревожности в условиях открытой арены животные проявляют меньшую двигательную активность, стараясь найти укрытие вне центра арены. Однако при пониженном уровне тревоги животные демонстрируют большую двигательную активность, обусловленную исследовательским поведением. Повышенный уровень вертикальной двигательной активности, выраженный в увеличении времени вставания на задние лапы с опорой на стенки, свидетельствует об активации исследовательского поведения, которое подавлено в условиях тревожного состояния. Статистически значимого повышения времени вставания на задние лапы без опоры не зафиксировано. Рядом авторов указывается, что данный вид двигательной активности самый сложный и требует значительной расслабленности животного [176].

Статистически значимо увеличивается общее время груминга, прежде всего за счёт изменения пропорции короткого и длительного (с увеличением части последнего). Короткий груминг, когда животное прерывает своё движение и садится чистить мордочку или за ушами, является индикатором повышенной активности симпатической нервной системы, активирующейся в ответ на стрессовое воздей-

ствии (хронический стресс+новые условия опытной арены). В то же время длительный груминг, когда животное чистит и вылизывает всё тело, в том числе и поверхности лап, является индикатором комфорта: отсутствие прямой опасности и повышенной тревожности позволяет расслабиться и потратить время на данный тип активности [139].

У крыс, получавших пептиды маточного молочка и трутневого расплода, достоверно увеличивается время демонстрации исследовательского поведения — норкового рефлекса. Отверстия в полу установки являются для крыс загадочным объектом, и повышение времени их исследования связано с неофилией. Повышение неофильной активности свидетельствует о сниженном уровне стресса, т. к. при повышенном уровне тревожности, вызванной хроническим стрессом, активность симпатической нервной системы будет подавлять желание исследовать неизвестное.

Достоверное снижение времени замирания животных, получавших пептиды маточного молочка и трутневого расплода, напрямую свидетельствует о понижении тревожности и стресса, т. к. замирание — естественная реакция грызунов на первые признаки опасности. В условиях данного теста при хроническом стрессе у животных с высоким уровнем тревоги даже малейшие аудиовизуальные стимулы будут вызывать обострённую реакцию, выражающуюся в чрезмерном замирании. Снижение общего времени замирания говорит, что животные меньше ожидают опасности в силу сниженного уровня тревожности, и не ассоциируют случайные внешние раздражители как факторы приближающейся опасности [139].

II. В классическом тесте на антидепрессантную активность «Вынужденное плавание» [229] животные, получавшие пептиды маточного молочка и трутневого расплода, проводят больше времени в состоянии активного плавания. В соответствии с дизайном данного эксперимента животные с высоким уровнем тревоги в сосуде с водой при невозможности выбраться из него будут демонстрировать меньшее время активного плавания и реакции «отчаяния» (замирание и преждевременное погружение).

III. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», который является

классическим тестом для оценки тревожного поведения, у животных, получавших пептиды маточного молочка и трутневого расплода, статистически достоверно повышено время нахождения в открытых рукавах и на центральной площадке опытной установки по сравнению с контрольными животными. Повышенное время нахождения в закрытых рукавах — свидетельство стрессового состояния крыс, проявления их тигмотаксиса. Отсутствие достоверного изменения в двигательной активности свидетельствует об отсутствии нейростимулирующего влияния пептидов маточного молочка и трутневого расплода и подтверждает наличие анксиолитического. Например, при приёме амфетамина крысы демонстрируют повышенную двигательную активность вместе с увеличением времени, проведённым в открытых рукавах, что зачастую интерпретируется как анксиолитическая активность, тогда как истинный анксиолитический эффект отсутствует [304].

IV. В тесте «Тёмная/светлая комната» животные, получавшие пептиды маточного молочка и трутневого расплода, статистически достоверно проводили больше времени в светлой части установки и большее число раз проходили через перегородку. Воздействие яркого света (более 700 люкс) воспринимается животными как стрессовый фактор, т. к. крысы преимущественно ночные животные, что вызывает у них желание спрятаться в тёмной части установки. Как следствие, у крыс с высоким уровнем тревожности будет наблюдаться пониженное время нахождения в освещённой части установки и повышенное в тёмной. Дополнительно у крыс с повышенной тревожностью в силу доминирования реакций симпатической нервной системы будет наблюдаться повышенный тигмотаксис и сниженная двигательная активность, что и выражается в снижении количества переходов между отсеками установки [122].

V. В тесте «Предпочтение сахарозы» у животных, получавших пептиды маточного молочка и трутневого расплода, статистически достоверно повышено потребление раствора сахарозы по сравнению с животными контрольной группы, что свидетельствует о сниженном уровне ангедонии.

Суть теста «Предпочтение сахарозы» состоит в формировании стойкого состояния хронического стресса и изучении характера взаимодействия лаборатор-

ных животных с первичными формами подкрепления. Ангедония является комплексным явлением, зачастую сопровождающим депрессивные состояния, выражающаяся в неспособности или отсутствии желания испытывать положительный ответ на различные формы подкрепления из-за нарушения работы системы внутреннего подкрепления. В ответ на формирование ангедонии животные с высоким уровнем стресса будут демонстрировать тенденцию к уменьшению доли потреблённого раствора сахарозы [283].

В целом, выбор интраназального способа введения растворов пептидов основан сложившейся научной практикой: большое количество исследований по изучению влияния пептидов на поведение экспериментальных животных использует именно интраназальный путь введения, характеризующийся быстрой доставкой субстанций в отделы центральной нервной системы, малым или отсутствием воздействия протеаз и малоинвазивным воздействием на животных [336].

4.4 Влияние низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства на активность карбоксипептидазы E и пептидил-дипептидазы A и уровень гормонов стресса

В ряде исследований по изучению пептидов продуктов пчеловодства установлено, что пептиды трутневого расплода при интраназальном введении в нормальных условиях изменяют поведение крыс в условиях тестов «Открытое поле» и «Условный пищедобывательный рефлекс» [9], влияют на активность карбоксипептидазы E [34], а пептиды пчелиного мёда влияют на активность АСТ и глицил-глицин-дипептидазы в нервной ткани крыс [8, 25]. Изучение влияния пептидов пчелиного мёда, маточного молочка и трутневого расплода на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса является логичным продолжением исследований в данной области, и в то же время обладает научной новизной, т. к. сведения о подобных эффектах пептидов продуктов пчеловодства в условиях хронического стресса в научной литературе отсутствуют.

В результате нашего эксперимента были получены данные, что интраназальное введение пептидов массой до 5 кДа, выделенных из маточного молочка и

трутневого расплода, влияет на активность КПЕ и ПДПА в разных отделах мозга, но не оказывает влияния на их активность в сыворотке крови и надпочечниках. Следовательно, при интраназальном введении исследованные пептиды действовали только в различных отделах головного мозга и не проникали в системный кровоток.

В ходе эксперимента было показано, что активность **КПЕ** под действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода **снижается в гипофизе, амигдале и продолговатом мозге**. Известно, что карбоксипептидаза E участвует в процессинге целого ряда регуляторных пептидов, действующих в данных регионах мозга (CART, инсулин, α -меланоцитостимулирующий гормон, адренокортикотропный гормон, нейропептид Y, мет- и лей-энкефалин, вазопрессина и окситоцина, соматостатина, ПОМК, амилина, холецистокинина, глюкагоноподобного пептида-1, переносчика дофамина, SAAS и т. д.) Повышенная активность КПЕ свидетельствует об интенсификации процессов биосинтеза, процессинга и сортировки этих нейропептидов [34]. Таким образом, повышенная активность КПЕ в гипофизе у крыс контрольной группы свидетельствует об активации процесса биосинтеза нейроактивных пептидов, вовлечённых в регуляцию ответа организма на хроническое стрессовое состояние. Следовательно, снижение ферментативной активности в гипофизе, амигдале и продолговатом мозге крыс, получавших пептиды маточного молочка и трутневого расплода, указывает на снижение синтетической активности гипофиза как причину анксиолитического эффекта. Похожее изменение гипофизарной активности карбоксипептидазы E наблюдалось в работах по изучению влияния антидепрессантов при системном введении на активность ферментов обмена регуляторных нейропептидов [26]. Ко всему прочему, амигдала и продолговатый мозг имеют большое значение в развитии и поддержании тревожности. Амигдала — ключевой центр мозга, регулирующий реакции страха и тревоги, имеет большое количество ГАМКергических нейронов, которые экспрессируют рецепторы к различным нейропептидам, в том числе к соматостатину. Установлено, что активация соматостатиновых нейронов в амигдале приводит к замиранию животного [104], поэтому пониженная активность карбоксипептидазы E, участву-

ющей в сортинге и созревании этого нейропептида, может свидетельствовать об изменении его концентрации. Продолговатый мозг участвует в регуляции работы симпатической нервной системы, влияя на тонус скелетной мускулатуры и работу сердца. В экспериментальных работах показано, что в продолговатом мозге находятся пресимпатические нейроны с везикулами, внутри которых найден ряд нейропептидов (ВИП, нейропептид Y, холецистокинин, октапептид, нейротензин, кальцитонин-ген родственный пептид, энкефалин, тиротропинг-релизинг гормон, вещество P [209]). Для многих из этих нейропептидов показано участие КПЕ в их процессинге. Таким образом, в нашем эксперименте пониженный уровень активности карбоксипептидазы E может физиологически находить отражение в снижении тревожности за счёт понижения концентрации нейропептидов в данном регионе мозга, что ведёт к понижению тонуса симпатической нервной системы.

В четверохолмии, стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе под действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода **активность КПЕ повышается**. Под действием хронического стресса гипоталамус повышает секреторную активность как механизм адаптации для позитивной модуляции работы ГГНО. Однако отсутствие изменения в уровнях АКТГ, кортикостерона и КПЕ в надпочечниках свидетельствует, что данная модуляция блокируется на следующих этапах работы ГГНО. Повышение активности КПЕ в гиппокампе и четверохолмии может быть связано с активацией этих структур за счёт новизны обстановки. Известно, что поведенческие тесты приводят к активации нейронных путей в гиппокампе с целью закрепления памяти о навигации в новом месте, а соматостатин и нейропептид Y играют важную роль в формировании ассоциативной памяти [86]. Активация нейронных структур приводит и к увеличению активности ферментов процессинга нейропептидов. Стриатум обладает тормозной активностью по отношению к напряжённой мышечной мускулатуре [191]. Состояние хронического стресса на физиологическом уровне, в том числе, характеризуется повышенным тонусом мускулатуры, а снижение этого напряжения опосредованно через активацию стриатума. Повышение активности КПЕ может свидетельствовать об активации процессов синтеза и созревания нейропептида Y, энкефалина, нейротензина и ди-

норфина в этом отделе головного мозга.

Под действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода была также снижена активность пептидил-дипептидазы А в гипоталамусе, гипофизе, стриатуме, амигдале, четверохолмии и продолговатом мозге. Известно, что действие ПДПА разносторонне. Наряду с регуляцией артериального давления и водно-солевого баланса 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. Тем самым фермент участвует в процессинге брадикинина, мет-энкефалин-Arg-Phe, ангиотензина II, регулируя работу симпатической нервной системы через образование ангиотензина II (дополнительно, N-концевой пептид ангиотензина II участвует в метаболизме вазопрессина). В различных экспериментальных работах установлено, что под влиянием ангиотензина II у животных снижается эффективность ассоциативной памяти и способность к обучению [223]. Поскольку ангиотензин II не проникает через ГЭБ, считается, что он образуется в результате работы внутримозговой ПДПА. Также есть данные, что фермент обладает эндопептидазной активностью, катализируя расщепление вещества Р, вещества К, холецистокинина, аргинин-вазопрессина, окситоцина, гастрина, гонадотропин-рилизинг фактора, des-Arg⁹-брадикинина, ангиотензина 1-7, β-амилоидный пептида, а также вовлечён в метаболизм нейрокининов [26]. Известно также, что ангиотензин II, образующийся из ангиотензина I при участии ПДПА в головном мозге, способствуют активации ГГНО, оказывает стимулирующее влияние на секрецию АКТГ гипофизом и кортикотропин-рилизинг фактора гипоталамусом [324].

Проанализировав характер изменения активности ПДПА в нервной ткани крыс можно сказать следующее:

1. В гипофизе и гипоталамусе снижение активности ПДПА может приводить к изменению концентрации ангиотензина II, который участвует в регуляции ответа организма на стресс.
2. В стриатуме снижение активности ПДПА может приводить к понижению

общего уровня стресса за счёт модуляции работы опиоидной и дофаминергических систем [105, 368]. Также экспериментально показано, что при введении каптоприла лабораторные животные демонстрировали снижение негативных последствий стресса, вызванного вследствие введения животным ЛПС, на пространственную память [48]. Таким образом, ПДПА приводит к снижению негативных последствий стресса.

3. В базолатеральных ядрах амигдалы имеются ГАМКергические нейроны, содержащие холецистокинин [78], в центральных ядрах — содержащие энкефалины и динорфин [286]. Эти пептиды являются субстратами для ПДПА. Вместе с тем амигдала играет важную роль в формировании ответа на стрессовые ситуации, регуляции поведения, уровня страха и тревожности. Таким образом, снижение активности ПДПА в амигдале под действием изученных пептидов может являться механизмом уменьшения активности ГАМКергических нейронов, что снижает общую восприимчивость к стрессу.
4. Показано, что в четверохолмии экспрессируются рецепторы к ангиотензину II, которые при стимуляции подавляют способность нейронов активироваться в ответ на визуальные стимулы [271]. 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. Ко всему прочему найдено, что в четверохолмии экспрессируются мРНК других нейропептидов, в процессинг которых вовлечена ПДПА [188]. Однако в научной литературе крайне мало данных об их роли в регуляции интегративной функции четверохолмия для аудиовизуальных стимулов и рефлексов.
5. Снижение активности ПДПА в продолговатом мозге также отражает анксиолитический эффект пептидов маточного молочка и трутневого расплода. Продолговатый мозг участвует в регуляции тревожного поведения, обеспечивая связь между высшей нервной системой и спинным мозгом. Известно,

что существуют множественные проекции в продолговатый мозг из стресс-активируемых или стресс-генерирующих структур [198, 293, 389], а рецепторы к ангиотензину II широко экспрессируются в тканях продолговатого мозга [59]. Таким образом, снижение активности ПДПА в продолговатом мозге, вероятно, является результатом анксиолитического действия пептидов.

Статистически значимого влияния пептидов пчелиного мёда на активность обоих ферментов установлено не было.

Не было найдено прямого влияния пептидов маточного молочка и трутневого расплода на активность КПЕ и ПДПА *in vitro*. Следовательно, сдвиги в активности данных ферментов обмена регуляторных пептидов не являются причиной наблюдаемого анксиолитического действия пептидов пчелопродуктов. По-видимому, низкомолекулярные пептиды маточного молочка и трутневого расплода действуют через пока ещё неизвестные клеточные мишени, что приводит к изменению функционирования пептидергической системы через регуляцию активности ферментов процессинга нейропептидов.

ВЫВОДЫ

1. Применённая комбинация ультрафильтрации и хроматографических методов позволяет выделить и очистить пептиды маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда от низкомолекулярных примесей. Степень очистки в среднем составляет 5% для пептидов маточного молочка, 1,6% для гомогената трутневого расплода и 12,1% для пептидов пчелиного мёда (в пересчёте на общее содержание белковых веществ).
2. Пептидный спектр маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда характеризуется значительным разнообразием. На хроматограммах было выявлено присутствие 9 пиков индивидуальных пептидов в маточном молочке, 11 в гомогенате трутневого расплода и 10 в пчелином мёде. 7 из 9 выделенных пептидов маточного молочка при $pH = 10$ заряжены отрицательно, среди пептидов трутневого расплода и пчелиного мёда таких 2 и 4 соответственно. Среди пептидов маточного молочка массой до 5 кДа 5 имеют в своём составе аминокислоты с ароматическими радикалами, 4 в трутневом расплоде и 3 в пчелином мёде.
3. Низкомолекулярные пептиды трутневого расплода и маточного молочка при постоянном интраназальном введении в дозе 300 мкг/кг массы тела в условиях хронического стресса снижают интенсивность проявления поведения, ассоциированного с тревожностью, у экспериментальных животных. Например, в тесте «Открытое поле» увеличивается продолжительность длительного груминга на 81,5% и 62,1% соответственно, время проявления норкового рефлекса было увеличено на 45% и 60% соответственно. В тесте «Тёмная/светлая комната» время нахождения в светлом отсеке опытной установки было увеличено в 2,75 и 2,86 раза соответственно.
4. Под действием низкомолекулярных пептидов трутневого расплода и маточного молочка изменяется активность карбоксипептидазы E и пептидилдипептидазы A в нервной ткани и гипофизе крыс. Активность карбоксипептидазы E снижается в гипофизе (на 60% и 70% соответственно), амигдале

(на 53% и 44%) и продолговатом мозге (на 37% и 44%), но повышается в гипоталамусе (на 94% и 172%), стриатуме (на 86% и 114%), гиппокампе (в 2,16 и 2,89 раза) и четверохолмии (на 96% и 54%). Активность пептидилдипептидазы А снижается в гипофизе (на 46% и 54%), гипоталамусе (на 37% и 44%), стриатуме (на 37% и 40%), амигдале (на 53% и 56%), четверохолмии (на 57% и 54%) и продолговатом мозге (на 40% и 45%). Низкомолекулярные пептиды продуктов пчеловодства не оказывают влияния на активность обоих ферментов в сыворотке крови, надпочечниках и *in vitro*, а также концентрацию АКТГ и кортикостерона.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск новых биологически активных агентов всегда будет являться одной из приоритных задач биологии. Экспериментальные результаты данной работы ещё раз доказывают, что низкомолекулярные пептиды обладают чрезвычайно разнообразным спектром биологической активности. Однако при изучении биоэффектов низкомолекулярных пептидов встаёт множество препятствий, одно из которых — трудность их выделения и очистки. Применённая в данной работе комбинация ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации позволяет очистить часть пептидов массой до 5 кДа от низкомолекулярных примесей, зачастую составляющих большинство компонентов продукта пчеловодства.

Полученные экспериментальные результаты являются одновременно и продолжением многолетних исследований в области биологической активности продуктов пчеловодства, идущих в лабораториях кафедры «Общая биология и биохимия» Пензенского государственного университета, и начальным этапом оценки таковой низкомолекулярных пептидов, выделенных из пчелиного мёда, трутневого расплода и маточного молочка. **Перспективы дальнейшей разработки темы** лежат в области более детального изучения структуры выделенных пептидов современными методами биохимии (масс-спектрометрия, секвенирование и т. д.), а также механизмов проявления их биологической активности.

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

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

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин, И. П. Нейрохимия: учебник для биологических и медицинских вузов / И. П. Ашмарин, П. В. Стукалова. — Москва: Издательство Института биомедицинской химии РАМН, 1996. — 470 с.
2. Беклемишев, А. Б. Исследование мутагенного и общетоксического воздействия 1,1-диметилгидразина и продуктов его трансформации на клетки биосенсорных штаммов *E. coli* и клетки эукариот / А. Б. Беклемишев, И. А. Лавриенко, А. В. Рябченко, В. И. Ткаченко, С. Е. Батырбекова, В. А. Лавриенко, А. В. Бабина // Бюллетень СО РАМН. — 2013. — Т. 30, №2. — С. 17-22.
3. Болдырев, А. А. Нейрохимия. Учебное пособие для вузов / А. А. Болдырев, Н. Д. Ещенко, В. А. Илюха, Е. И. Кяйвярайнен. — Москва: Дрофа, 2010. — 398 с.
4. Брандорф, А. С. Влияние породной принадлежности медоносных пчел на критерии качества маточного молочка / А. С. Брандорф, Л. А. Репьева, Н. В. Будникова // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П. А. Костычева. — 2021. — Т. 13, № 4. — С. 17-24.
5. Бурмистрова, Л. А. Биологически активные вещества трутневого расплода на разных стадиях развития / Л. А. Бурмистрова, Н. В. Будникова, М. Н. Харитоновна // Современные направления научно-технического прогресса в пчеловодстве: материалы Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Г. Ф. Таранова. — Рыбное, 2007. — С. 298-301.
6. Генгин, М. Т. Перспективный метод оценки качества мёда / М. Т. Генгин, С. В. Клыченков, В. Б. Соловьев, Г. А. Карпова // Пчеловодство. — 2017. — № 2. — С. 51-52.
7. ГОСТ Р 56991-2016. Дезинфектология и дезинфекционная деятельность. Химические дезинфицирующие средства и антисептики. Метод определения перекиси водорода. — Москва: Стандартинформ, 2016. — 12 с.
8. Григорьева, О. М. Активность глицилглицин-дипептидазы в отделах головного мозга крыс при однократном введении пептидов водного экстракта личинок трутневого расплода / О. М. Григорьева // Современные тенденции развития науки и техно-

логий. — 2015. — № 1-1. — С. 78-80.

9. Гришина, Ж. В. Белки, пептиды и ферменты их обмена в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчёл: автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук / Гришина Жанна Владимировна; Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных. — Боровск, 2017. — 22 с.

10. Доброхотова, Ю. Э. Комбинация фитоэстрогенов и β -аланина в альтернативной негормональной терапии климактерического синдрома / Ю. Э. Доброхотова, В. В. Романовская // *Opinion Leader*. — 2020. — № 2(31). — С. 80-88.

11. Ефанова, Н. В. Коррекция эндокринного и метаболического статуса собак с помощью трутневого гомогената / Н. В. Ефанова, Д. С. Михайлова // Теория и практика современной аграрной науки: Сборник II Национальной (всероссийской) конференции. — Новосибирск, 2019. — С. 406-409.

12. Ишмуратова, Н. М. Антидотная активность компонентов маточного вещества и маточного молочка / Н. М. Ишмуратова, Г. Ю. Ишмуратов, Г. А. Толстикова, А. Ф. Исмагилова, А. Е. Белов // *Пчеловодство*. — 2007. — № 5. — С. 56-57.

13. Кароматов, И. Д. Маточное пчелиное молочко и метаболический синдром / И. Д. Кароматов, Р. С. Халилова // *Биология и интегративная медицина*. — 2020. — № 3(43). — С. 75-89.

14. Киселёва, В. А. Сравнительная характеристика актопротекторного действия композиций, содержащих маточное молочко и другие биологически активные продукты пчеловодства / В. А. Киселёва, М. А. Киселёв, М. А. Непеин // *Вестник Московского государственного областного гуманитарного института. Серия: Медико-биологические науки*. — 2014. — № 2. — С. 55-64.

15. Киселёва, В. А. Хромато-масс-спектрометрическое исследование химического состава продуктов пчеловодства как инструмента для конструирования новых лечебных композиций на их основе / В. А. Киселёва, В. В. помазанов, С. Г. Марданлы, Е. П. Рогожникова, С. И. Зыкова // *Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. — Орехово-Зуево, 2018. — С. 66-77.

16. Клыченков, С. В. Антибактериальная активность пчелиного мёда и его пептидных фракций / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина, Л. А. Бичурина // Учёные записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. — 2021. — Т. 7, № 3. — С. 101-111.
17. Клыченков, С. В. Антимикробные пептиды мёда, перспективы их получения и использования / С. В. Клыченков // Вестник Пензенского государственного университета. — 2017. — № 4(20). — С. 60-66.
18. Клыченков, С. В. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на степень развития ангедонии у крыс в условиях хронического стресса / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина // Научный аспект. — 2022. — Т. 5, № 5. — С. 601-607.
19. Клыченков, С. В. Изучение антибактериальной активности пептидных фракций маточного молочка и трутневого расплода / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина, Л. А. Бичурина, И. А. Сорокин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. — 2022. — № 4(64). — С. 97-106.
20. Клыченков, С. В. Изучение влияния пептидов продуктов пчеловодства на активность пептидил-дипептидазы А в сыворотке крови и нервной ткани крыс в условиях хронического стресса / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина // Технологии живых систем. — 2023. — Т. 20, №2. — С. 73-80.
21. Клыченков, С. В. Изучение влияния пептидов продуктов пчеловодства на поведение крыс в условиях хронического стресса / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина, О. А. Левашова, С. С. Гамзин // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. — 2023. — Т. 44. — С. 68-77.
22. Клыченков, С. В. 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.
23. Клыченков, С. В. Способ выделения и очистки низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства с использованием хроматографических методов / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2023. — Т. 23, №1. — С. 107-115.

24. Костина, Д. А. Влияние биологически активных пептидных компонентов гемолимфы личинок *Galleria mellonella* на рост и ферментативную активность *Escherichia coli* / Д. А. Костина, О. С. Федоткина, Н. А. Кленова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. — 2013. — Т. 15, № 3-1. — С. 567-574.
25. Кротова, Ю. Г. Изучение влияния интраназального введения фракций пептидов мёда на активность АСТ в нервной ткани крыс / Ю. Г. Кротова // EurasiaScience: Сборник статей Международной научно-практической конференции. — Москва, 2015. — С. 16-18.
26. Кручинина, А. Д. Влияние селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов на активность ферментов обмена регуляторных пептидов в отделах мозга, надпочечниках и сыворотке крови крыс: автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук / Кручинина Анастасия Дмитриевна; Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы. — Москва, 2016. — 22 с.
27. Лазарян, Д. С. Исследование химического состава, оценка биологической активности пчелиного расплода и получение на его основе лекарственных препаратов: автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора фармацевтических наук / Д. С. Лазарян; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. — Пятигорск, 2002. — 43 с.
28. Леушкина, Н. Ф. Ассоциация полиморфного ДНК-локуса *pcoi* гена *drd2* и уровней дофамина с повышенной тревожностью / Н. Ф. Леушкина, А. Я. Ханнанова, А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина // Успехи современного естествознания. — 2011. — № 5. — С. 19-21.
29. Литвин, Ф. Б. Влияние биологически активной добавки на основе гомогената трутневых личинок на микроциркуляцию и обмен веществ у лыжников-гонщиков / Ф. Б. Литвин, Т. М. Брук, П. А. Терехов, И. А. Прохода, Д. Б. Никитюк, С. В. Ключкова // Спортивная медицина: наука и практика. — 2018. — Т. 8, № 3. — С. 88-95.
30. Литвин, Ф. Б. Влияние препарата «Билар» на вегетативную регуляцию сердечного ритма юных спортсменов / Ф. Б. Литвин, И. А. Прохода, Е. П. Морозова, С. С.

Голощапова, В. В. Силуванов, М. А. Аверьянова // Ежегодник НИИ фундаментальных и прикладных исследований. — 2014. — № 1(5). — С. 50-55.

31. Митрофанов, Д. В. Антиоксидантные соединения в гомогенате трутневого расплода разного возраста / Д. В. Митрофанов, Н. В. Будникова, С. Н. Есенкина, Л. А. Репьева // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. — 2021. — Т. 10, № 1. — С. 273-276.

32. Митрофанов, Д. В. Гормоны трутневого расплода медоносных пчел разного возраста / Д. В. Митрофанов, Н. В. Будникова, Л. А. Бурмистрова // Пчеловодство. — 2015. — № 7. — С. 58-59.

33. Митрофанов, Д. В. Стресс и продукты пчеловодства / Д. В. Митрофанов, А. С. Лизунова, Е. А. Вахонина // Стресс и здоровье человека: сборник статей Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. — Нижний Новгород, 2021. — С. 151-168.

34. Моисеева, А. А. Влияние пептидов личинок трутневого расплода на активность карбоксипептидазы Н / А. А. Моисеева, М. Т. Генгин, Ж. В. Гришина // Actualscience. — 2015. — Т. 1, № 5(5). — С. 7-9.

35. Моисеева, А. А. Нейростимулирующие свойства препарата пептидов, выделенных из личинок трутневого расплода / А. А. Моисеева, М. Т. Генгин, Ж. В. Гришина // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. — 2015. — № 4(12). — С. 3-9.

36. Нарижный, А. Г. Влияние маточного молочка на воспроизводительные способности хряков / А. Г. Нарижный, Н. С. Гнеушева, Г. В. Ескин, Л. Ю. Лужных // Современные направления научно-технического прогресса в пчеловодстве: материалы Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Г. Ф. Таранова. — Рыбное, 2007. — С. 242-247.

37. Нехорошкова, А. Н. Нейробиологические предпосылки формирования тревожных состояний / А. Н. Нехорошкова, И. Л. Большевидцева // Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Медико-биологические науки. — 2016. — № 3. — С. 24-36.

38. Патент РФ № 2415611 С1 Российская Федерация, МПК А23L 1/30, А23L 1/076.

Биологически активная добавка к пище для профилактики заболеваний и оздоровления сердечно-сосудистой системы: № 2009144334/13 / Елистратов Д. Г., Трифонов В. Н. — 6 с.

39. Патент № 2609872 С Российская Федерация, МПК А61К 35/64, А61К 35/644, А61Р 9/10. Способ получения биопрепарата, обладающего ноотропным действием: № 2015150665 / Моисеева А. А., Генгин М. Т. — 7 с.

40. Помазанов, В. В. Газовая хромато-масс-спектрометрия трутневого расплода / В. В. Помазанов, В. А. Киселёва, С. Г. Марданлы, Л. А. Бурмистрова // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции с международным участием. — Орехово-Зуево, 2017. — С. 173-176.

41. Помазанов, В. В. Трутневый расплод — как сырьё для производства лечебных и оздоровительных препаратов / В. В. Помазанов, В. А. Киселёва, С. Г. Марданлы, Е. П. Рогожникова // Современные аспекты лабораторной диагностики и инноваций в медицине: Сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. — Орехово-Зуево, 2018. — С. 63-74.

42. Помазанов, В. В. Хромато-масс-спектрометрическое исследование химического состава продуктов пчеловодства как инструмента для конструирования новых лечебных композиций на их основе / В. В. Помазанов, В. А. Киселёва, С. Г. Марданлы, Е. П. Рогожникова, Г. В. Помазанов // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. В 2 томах. — Орехово-Зуево, 2019. — Т. 2. — С. 228-237.

43. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунатян, А. Н. Васильев [и др.]. Москва: Гриф и К, 2012. — 944 с.

44. Савинкова, Е. А. Пищевая и биологическая ценность пчелиного меда / Е. А. Савинкова, Г. Р. Сагидуллина // Актуальные исследования. — 2021. — № 2(29). — С. 24-27.

45. Филиппович, Ю. Б. Практикум по общей биохимии: учебное пособие для сту-

дентов химических специальностей педагогических институтов. — Москва: Просвещение, 1982. — 311 с.

46. Хабибуллин, Р. М. Нормализация физиологических процессов при физических нагрузках на фоне применения адаптогенов / Р. М. Хабибуллин, И. М. Хабибуллин, И. В. Миронов // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. — 2021. — № 4(65). — С. 193-199.

47. Ярова, О. А. Применение метода определения содержания пероксида водорода для ветеринарно-санитарной оценки меда / О. А. Ярова, А. В. Лобанов // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. — 2012. — № 1(7). — С. 1-5.

48. Abareshi, A. The effects of captopril on lipopolysaccharide induced learning and memory impairments and the brain cytokine levels and oxidative damage in rats / A. Abareshi, M. Hosseini, F. Beheshti, F. Norouzi, M. Khazaei, H. R. Sadeghnia, M. H. Boskabady, M. N. Shafei, A. Anaeigoudari // Life Sciences. — 2016. — Vol. 167. — P. 46–56.

49. Abe, K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // The Journal of Neuroscience. — 1996. — Vol. 16, № 3. — P. 1066–1071.

50. Abu-Serie, M. M. Two purified proteins from royal jelly with in vitro dual anti-hepatic damage potency: Major royal jelly protein 2 and its novel isoform X1 / M. M. Abu-Serie, N. H. Habashy // International Journal of Biological Macromolecules. — 2019. — Vol. 128. — P. 782–795.

51. Ackermann, T. F. Phosphatidylinositide Dependent Kinase Deficiency Increases Anxiety and Decreases GABA and Serotonin Abundance in the Amygdala / T. F. Ackermann, H. Hörtnagl, D. P. Wolfer, G. Colacicco, R. Sohr, F. Lang, R. Hellweg, U. E. Lang // Cellular Physiology and Biochemistry. — 2008. — Vol. 22, № 5–6. — P. 735–744.

52. Adeniyi, I. A. Evaluation of the Effects of Honey on Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior and Oxidative Stress in Swiss Mice / I. A. Adeniyi, T. A. Omolowo, O. Oyebanjo, S. A. Onasanwo // Archives of Basic and Applied Medicine. — 2022. — Vol. 10, №. 2. — P. 108-114.

53. Ahmad, S. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal

Jelly / S. Ahmad, M. G. Campos, F. Frantini, S. Z. Altaye, J. Li // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — Vol. 21, № 2. — P. 382.

54. Ahmadian-Moghadam, H. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide / H. Ahmadian-Moghadam, M.-S. Sadat-Shirazi, M.-R. Zarrindast // *Peptides*. — 2018. — Vol. 110. — P. 56–77.

55. Akbari, M. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphisms and risk of psychiatric disorders / M. Akbari, R. Eghtedarian, B. M. Hussien, S. Eslami, M. Taheri, S. Ghafouri-Fard // *BMC Psychiatry*. — 2022. — Vol. 22. — № 1.

56. Akimova, E. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders / E. Akimova, R. Lanzenberger, S. Kasper // *Biological Psychiatry*. — 2009. — Vol. 66, № 7. — P. 627–635.

57. Albert, P. R. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression / P. R. Albert, F. Vahid-Ansari, C. Luckhart // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. — 2014. — Vol. 8.

58. Albert, Š. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library / Š. Albert, J. Klaudivy // *Journal of Insect Physiology*. — 2004. — Vol. 50, № 1. — P. 51–59.

59. Allen, A. M. Angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the medulla oblongata / A. M. Allen, S. Y. Chai, P. M. Sexton, S. J. Lewis, A. J. Verberne, B. Jarrott, W. J. Louis, J. Clevers, M. J. McKinley, G. Paxinos // *Hypertension*. — 1987. — Vol. 9, № 6. — P. 192–205.

60. Amat, J. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat / J. Amat, P. Matus-Amat, L. R. Watkins, S. F. Maier // *Brain Research*. — 1998. — Vol. 812, № 1–2. — P. 113–120.

61. Amiel, J. M. Glutamate and anxiety disorders / J. M. Amiel, S. J. Mathew // *Current Psychiatry Reports*. — 2007. — Vol. 9, № 4. — P. 278–283.

62. Amilhon, B. VGLUT3 (Vesicular Glutamate Transporter Type 3) Contribution to the Regulation of Serotonergic Transmission and Anxiety / B. Amilhon, È. Lopicard, T. Renoir, R. Mongeau, D. Popa, O. Poirel, S. Miot, C. Gras, A. M. Gardier, J. Gallego, M. Hamon, L. Lanfumey, B. Gasnier, B. Giros, S. El Mestikawy // *The Journal of Neuroscience*. — 2010. — Vol. 30, № 6. — P. 2198–2210.

63. Asakawa, A. Leptin treatment ameliorates anxiety in ob/ob obese mice / A. Asakawa, A. Inui, T. Inui, G. Katsuura, M. A. Fujino, M. Kasuga, // *Journal of Diabetes and its Complications*. — 2003. — Vol. 17, № 2. — P. 105–107.
64. Averill, L. A. Glutamate dysregulation and glutamatergic therapeutics for PTSD: Evidence from human studies / L. A. Averill, P. Purohit, C. L. Averill, M. A. Boesl, J. H. Krystal, C. G. Abdallah // *Neuroscience Letters*. — 2017. — Vol. 649. — P. 147–155.
65. Azimpour, M. The Effect of Royal Jelly on Depression and Anxiety in an Animal Model of Alzheimer’s Disease / M. Azimpour, M. Fathi, O. Dezfoulian // *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. — 2021. — Vol. 9, № 2. — P. 79–90.
66. Azizi, M. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline / M. Azizi, A. Rousseau, E. Ezan, T. T. Guyene, S. Michelet, J. M. Grognet, M. Lenfant, P. Corvol, J. Ménard // *Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation*. — 1996. — Vol. 97, № 3. — P. 839–844.
67. Azman, K. F. Tualang Honey Exerts Antidepressant-like Effects and Antioxidant Properties in Stress-exposed Rats / K. F. Azman, R. Zakaria, C. B. Abdul Aziz, Z. Othman // *Malaysian Journal of Applied Sciences*. — 2019. — Vol. 4, №1. — P. 15-25.
68. Azman, K. F. Tualang honey improves memory performance and decreases depressive-like behavior in rats exposed to loud noise stress / K. F. Azman, R. Zakaria, C. B. AbdAziz, Z. Othman, B. Al-Rahbi // *Noise and Health*. — 2015. — Vol. 17, № 75. — P. 83.
69. Bäckström, T. Allopregnanolone and mood disorders / T. Bäckström, M. Bixo, M. Johansson, S. Nyberg, L. Ossewaarde, G. Ragagnin, I. Savic, J. Strömberg, E. Timby, F. van Broekhoven, G. van Wingen // *Progress in Neurobiology*. — 2014. — Vol. 113. — P. 88–94.
70. Bagameri, L. Royal Jelly as a Nutraceutical Natural Product with a Focus on Its Antibacterial Activity / L. Bagameri, G.-M. Baci, D. S. Dezmirean // *Pharmaceutics*. — 2022. — Vol. 14, № 6. — P. 1142.
71. Bahi, A. Decreased anxiety, voluntary ethanol intake and ethanol-induced CPP acquisition following activation of the metabotropic glutamate receptor 8 “mGluR8” / A. Bahi // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. — 2017. — Vol. 155. — P. 32–42.

72. Bahi, A. Dopamine transporter (DAT) knockdown in the nucleus accumbens improves anxiety- and depression-related behaviors in adult mice / A. Bahi, J.-L. Dreyer // *Behavioural Brain Research*. — 2019. — Vol. 359. — P. 104–115.
73. Bali, A. An Integrative Review on Role and Mechanisms of Ghrelin in Stress, Anxiety and Depression / A. Bali, A. Singh Jaggi // *Current Drug Targets*. — 2016. — Vol. 17, № 5. — P. 495–507.
74. Ballaz, S. J. Cholecystokinin-Mediated Neuromodulation of Anxiety and Schizophrenia: A “Dimmer-Switch” Hypothesis / S. J. Ballaz, M. Bourin // *Current Neuropharmacology*. — 2021. — Vol. 19, № 7. — P. 925–938.
75. Barrera, G. One for all or one for one: does co-transmission unify the concept of a brain galanin “system” or clarify any consistent role in anxiety? / G. Barrera, D. J Echevarria, J.-F. Poulin, S. Laforest, G. Drolet, D. A Morilak // *Neuropeptides*. — 2005. — Vol. 39, № 3. — P. 289–292.
76. Barry, A. L. Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test / A. L. Barry, M. B. Coyle, C. Thornsberry, E. H. Gerlach, R. W. Hawkinson // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1979. — Vol. 10, № 6. — P. 885–889.
77. Bernstein, K. E. A Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme / K. E. Bernstein, F. S. Ong, W.-L. B. Blackwell, K. H. Shah, J. F. Giani, R. A. Gonzalez-Villalobos, X. Z. Shen, S Fuchs // *Pharmacological Reviews*. — 2012. — Vol. 65, № 1. — P. 1–46.
78. Berretta, S. Long-term effects of amygdala GABA receptor blockade on specific subpopulations of hippocampal interneurons / S. Berretta, N. Lange, S. Bhattacharyya, R. Sebro, J. Garces, F. M. Benes // *Hippocampus*. — 2004. — Vol. 14, № 7. — P. 876–894.
79. Berry, A. S. Dopaminergic Mechanisms Underlying Normal Variation in Trait Anxiety / A. S. Berry, R. L. White 3rd, D. J. Furman, J. R. Naskolnakorn, V. D. Shah, M. D'Esposito, W. J. Jagust // *The Journal of Neuroscience*. — 2019. — Vol. 39, № 14. — P. 2735–2744.
80. Bérubé, P. Enkephalin Knockdown in the Basolateral Amygdala Reproduces Vulnerable Anxiety-Like Responses to Chronic Unpredictable Stress / P. Bérubé, J.-F. Poulin, S. Laforest, G. Drolet // *Neuropsychopharmacology*. — 2013. — Vol. 39, № 5. — P. 1159–

1168.

81. Bíliková, K. Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2 / K. Bíliková, E. Mirgorodskaya, G. Bukovská, J. Gobom, H. Lehrach, J. Simúth // *Proteomics*. — 2009. — Vol. 9, № 8. — P. 2131–2138.
82. Bingham, R. J. Structural diversity of angiotensin-converting enzyme. Insights from structure-activity comparisons of two *Drosophila* enzymes / R. J. Bingham, V. Dive, S. E. V. Phillips, A. D. Shirras, R. E. Isaac // *FEBS Journal*. — 2006. — Vol. 273, № 2. — P. 362–373.
83. Bobiș, O. Honey and Diabetes: The Importance of Natural Simple Sugars in Diet for Preventing and Treating Different Type of Diabetes / O. Bobiș, D. S. Dezmirean, A. R. Moise // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. — 2018. — Vol. 2018. — P. 1–12.
84. Bodnarchuk, L. I. ATPase and phosphatase activity of drone brood / L. I. Bondarchuk, O. S. Stakhman // *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal* (1999). — 2004. — Vol. 76, №6. — P. 123-126.
85. Borbély, É. Hemokinin-1 mediates anxiolytic and anti-depressant-like actions in mice / É. Borbély, Z. Hajna, L. Nabi, B. Scheich, V. Tékus, K. László, T. Ollmann, V. Kormos, B. Gaszner, Z. Karádi, L. Lénárd, C. J. Paige, J. P. Quinn, J. Szolcsányi, E. Pintér, J. Keeble, A. Berger, Z. Helyes // *Brain, Behavior, and Immunity*. — 2017. — Vol. 59. — P. 219–232.
86. Borbély, É., Scheich B., Helyes Z. Neuropeptides in learning and memory / É. Borbély, B. Scheich, Z. Helyes // *Neuropeptides*. — 2013. — Vol. 47, № 6. — P. 439–450.
87. Borisov, V. B. Cytochrome b oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: An additional defense against oxidative stress / V. B. Borisov, E. Forte, A. Davletshin, D. Mastronicola, P. Sarti, A. Giuffrè // *FEBS Letters*. — 2013. — Vol. 587, № 14. — P. 2214–2218.
88. Borkovcová, M. Use of Foods Based on Bee Drone Brood: Their Sensory and Microbiological Evaluation and Mineral Composition / M. Borkovcová, J. Mlček, A. Adámková, M. Adámek, M. Bednářová, Z. Musilová, V. Ševčíková // *Sustainability*. — 2022. — Vol. 14, № 5. — P. 2814.

89. Borrow, A. P. Neuroendocrine Regulation of Anxiety: Beyond the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis / A. P. Borrow, A. M. Stranahan, D. Suchecki, R. Yunes // *Journal of Neuroendocrinology*. — 2016. — Vol. 28, № 7.
90. Bosch, E. BDV Syndrome: an Emerging Syndrome With Profound Obesity and Neurodevelopmental Delay Resembling Prader-Willi Syndrome / E. Bosch., M. Hebebrand, B. Popp, T. Penger, B. Behring, H. Cox, S. Towner, C. Kraus, W. G. Wilson, S. Khan, M. Krumbiegel, A. B. Ekici, S. Uebe, R. Trollmann, J. Woelfle, A. Reis, G. Vasileiou // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2021. — № 12(106). — P. 3413-3427.
91. Botezan, S. Current Status of the Bioactive Properties of Royal Jelly: A Comprehensive Review with a Focus on Its Anticancer, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Effects / S. Botezan, G.-M. Baci, L. Bagameri, C. Paşca, D. S. Dezmirean // *Molecules*. — 2023. — Vol. 28, № 3.— P. 1510.
92. Boukraa, L. Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa* / L. Boukraa // *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutics*. — 2008. — Vol. 13, №4. — P. 330-333.
93. Boukraâ, L. Synergistic Effect of Starch and Royal Jelly Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / L. Boukraâ, A. Meslem, M. Benhanifia, S. M. Hammoudi // *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. — 2009. — Vol. 15, № 7. — P. 755–757.
94. Boukraâ, L. Synergistic Effect of Starch on the Antibacterial Activity of Honey / L. Boukraâ, K. Amara // *Journal of Medicinal Food*. — 2008. — Vol. 11, № 1. — P. 195–198.
95. Bowers, M. E. Neuropeptide regulation of fear and anxiety: Implications of cholecystokinin, endogenous opioids, and neuropeptide Y / M. E. Bowers, D. C. Choi, K. J. Ressel // *Physiology & Behavior*. — 2012. — Vol. 107, № 5. — P. 699–710.
96. Brady, S. *Basic Neurochemistry* / S. Brady. — Elsevier, 2012. — 1096 p.
97. Brudzynski K., Sjaarda C.P. Colloidal structure of honey and its influence on antibacterial activity / K. Brudzynski, C. P. Sjaarda // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. — 2021. — Vol. 20, № 2. — P. 2063–2080.
98. Brudzynski, K. A New Look on Protein-Polyphenol Complexation during Honey

Storage: Is This a Random or Organized Event with the Help of Dirigent-Like Proteins? / K. Brudzynski, C. Sjaarda, L. Maldonado-Alvarez // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8, № 8. — P. e72897.

99. Brudzynski, K. Honey Glycoproteins Containing Antimicrobial Peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, Are Responsible for the Cell Wall Lytic and Bactericidal Activities of Honey / K. Brudzynski, C. P. Sjaarda // PLoS ONE — 2015. — Vol. 10, № 4. P — e0120238.

100. Brudzynski, K., Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation / K. Brudzynski, K. Abubaker, D. Miotto // Food Chemistry. — 2012. — Vol. 133, № 2. — P. 329–336.

101. Brunello, N. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies / N. Brunello, P. Blier, L. L. Judd, J. Mendlewicz, C. J. Nelson, D. Souery, J. Zohar, G. Racagni // International Clinical Psychopharmacology. — 2003. — Vol. 18, № 4. — P. 191–202.

102. Bucekova, M. Effect of thermal liquefying of crystallised honeys on their antibacterial activities / M. Bucekova, V. Juricova, G. Di Marco, A. Gismondi, D. Leonardi, A. Canini, J. Majtan // Food Chemistry. — 2018. — Vol. 269. — P. 335–341.

103. Bures, E. J. Identification of incompletely processed potential Carboxypeptidase E substrates from CpEfat/CpEfat mice / E. J. Bures, P. L. Courchesne, J. Douglass, K. Chen, M. T. Davis, M. D. Jones, M. D. McGinley, J. H. Robinson, C. S. Spahr, J. Sun, R. C. Wahl, S. D. Patterson // Proteomics. — 2001. — Vol. 1, № 1. — P. 79–92.

104. Burg van den, E. H. Neuropeptide signalling in the central nucleus of the amygdala / E. H. Burg van den, R. Stoop // Cell and Tissue Research. — 2018. — Vol. 375, № 1. — P. 93–101.

105. 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.

106. Calipari, E. S. Dopamine Release in the Midbrain Promotes Anxiety / E. S.

Calipari // *Biological Psychiatry*. — 2020. — Vol. 88, № 11. — P. 815–817.

107. Carboni, L. Neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, and neurokinin A in brain regions of HAB rats correlate with anxiety-like behaviours / L. Carboni, A. El Khoury, D. I. Beiderbeck, I. D. Neumann, A. A. Mathé // *European Neuropsychopharmacology*. — 2022. Vol. 57. — P. 1–14.

108. Carreño Gutiérrez, H. Nitric oxide interacts with monoamine oxidase to modulate aggression and anxiety-like behaviour / H. C. Gutiérrez, A. O'Leary, F. Freudenberg, G. Fedele, R. Wilkinson, E. Markham, F. van Eeden, A. Reif, W. H. J. Norton // *European Neuropsychopharmacology*. — 2020. — Vol. 30. — P. 30–43.

109. Carvalho-Costa, P. G. Activation of locus coeruleus heme oxygenase-carbon monoxide pathway promoted an anxiolytic-like effect in rats / P. G. Carvalho-Costa, L. G. S. Branco, C. R. A. Leite-Panissi // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. — 2016. — Vol. 49, № 5. — e5135.

110. Carver, C. M. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability / C. M. Carver, D. S. Reddy // *Psychopharmacology*. — 2013. — Vol. 230, № 2. — P. 151–188.

111. Casteels, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst // *The EMBO Journal*. — 1989. — Vol. 8, № 8. — P. 2387–2391.

112. Casteels, P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*) / P. Casteels, C. Ampe, L. Riviere, J. Van Damme, C. Elicone, M. Fleming, F. Jacobs, P. Tempst // *European Journal of Biochemistry*. — 1990. — Vol. 187, № 2. — P. 381–386.

113. Casteels, P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*) / P. Casteels., C. Ampe, F. Jacobs, P. Tempst // *The Journal of biological chemistry*. — 1993. — Vol. 268, №10. — P. 7044–7054.

114. Castellon, R. Demystifying the ACE Polymorphism: From Genetics to Biology / R. Castellon, H. Hamdi // *Current Pharmaceutical Design*. — 2007. — Vol. 13, № 12. —

P. 1191–1198.

115. Castillo, P. E. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function / P. E. Castillo, T. J. Younts, A. E. Chávez, Y. Hashimoto-dani // *Neuron*. — 2012. — Vol. 76, № 1. — P. 70–81.

116. Catania, A. Melanocortins. Multiple Actions and Therapeutic Potential. — Springer New York, 2010. — 173 p.

117. Cawley, N. X. et al. New Roles of Carboxypeptidase E in Endocrine and Neural Function and Cancer / N. X. Cawley, W. C. Wetzel, S. R. K. Murthy, J. J. Park, K. Pacak, Y. Peng Loh // *Endocrine Reviews*. — 2012. — Vol. 33, № 2. — P. 216–253.

118. Cawley, N. X. Obese carboxypeptidase E knockout mice exhibit multiple defects in peptide hormone processing contributing to low bone mineral density / N. X. Cawley, T. Yanik, A. Woronowicz, W. Chang, J. C. Marini, Y. P. Loh // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. — 2010. — Vol. 299, № 2. — P. E189–E197.

119. Cazusa, R. A. Enhanced expression of heme oxygenase-1 in the locus coeruleus can be associated with anxiolytic-like effects / R. A. Cazusa, O. Pol, C. R. A. Leite-Panissi // *Behavioural Brain Research*. — 2018. — Vol. 336. — P. 204–210.

120. Chan-Zapata, I. Honey and its protein components: Effects in the cancer immunology / I. Chan-Zapata, M. R. Segura-Zapata // *Journal of Food Biochemistry*. — 2021. — Vol. 45, № 5. — e13613.

121. Chan, Q. W. Changes in protein expression during honey bee larval development / Q. Chan, L. J. Forster // *Genome Biology*. — 2008. — Vol. 9, № 10. — R156.

122. Chaouloff, F. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests / F. Chaouloff, M. Durand, P. Mormède // *Behavioural Brain Research*. — 1997. — Vol. 85, № 1. — P. 27–35.

123. Chen, D. Effect of Major Royal Jelly Proteins on Spatial Memory in Aged Rats: Metabolomics Analysis in Urine / D. Chen, F. Liu, J.-B. Wan, C.-Q. Lai, L.-R. Shen // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2017. — Vol. 65, № 15. — P. 3151–3159.

124. Chen, M. Hydrogen sulfide: a target to modulate oxidative stress and neuroplasticity for the treatment of pathological anxiety / M. Chen, C. Pritchard, D. Fortune, P. Kodi, M. Grados // *Expert Review of Neurotherapeutics*. — 2019. — Vol. 20, № 1. — P. 109–121.

125. Chen, X. Identification of anti-inflammatory vesicle-like nanoparticles in honey / X.

Chen, B. Liu, X. Li, T. T. An, Y. Zhou, G. Li, J. Wu-Smart, S. Alvarez, M. J. Naldrett, J. Eudy, G. Kubik, R. A. Wilson, S. D. Kachman, J. Cui, J. Yu // *Journal of Extracellular Vesicles*. — 2021. — Vol. 10, № 4. — e12069.

126. Cheng, Y. Carboxypeptidase E (NF- α 1): a new trophic factor in neuroprotection / Y. Cheng, N. X. Cawley, Y. P. Loh // *Neuroscience Bulletin*. — 2014. — Vol. 30, № 4. — P. 692–696.

127. Chepulis, L. M. The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats / L. M. Chepulis, N. J. Starkey, J. R. Waas, P. C. Molan // *Physiology & Behavior*. — 2009. — Vol. 97, № 3–4. — P. 359–368.

128. Cherchi, A. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey / A. Cherchi, L. Spanedda, C. Tuberoso, P. Cabras // *Journal of Chromatography A*. — 1994. — Vol. 669, № 1–2. — P. 59–64.

129. Choi, K. W. Comorbid Anxiety and Depression: Clinical and Conceptual Consideration and Transdiagnostic Treatment / K. W. Choi, Y.-K. Kim, H. J. Jeon // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. — 2020. — P. 219–235.

130. Cool, D. R. Carboxypeptidase E Is a Regulated Secretory Pathway Sorting Receptor: Genetic Obliteration Leads to Endocrine Disorders in Cpefat Mice / D. R. Cool, E. Normant, F. Shen, H. C. Chen, L. Pannell, Y. Zhang, Y. P. Loh // *Cell*. — 1997. — Vol. 88, № 1. — P. 73–83.

131. Corvol, P. Peptidyl dipeptidase A: Angiotensin I-converting enzyme / P. Corvol, T. A. Williams, F. Sourbrier // *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases*. — Elsevier, 1995. — P. 283–305.

132. Costa N. S. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? / N. S. Costa, M. A. Vicente, A. C. Cipriano, T. T. Miguel, R. L. Nunes-de-Souza // *Neuropharmacology*. — 2016. — Vol. 108. — P. 82–90.

133. Cryan, J. F. The Microbiota-Gut-Brain Axis / J. F. Cryan // *Physiological Reviews*. American Physiological Society — 2019. — Vol. 99, № 4. — P. 1877–2013.

134. Cryan, J.F. Don't worry 'B' happy!: a role for GABAB receptors in anxiety and depression / J. F. Cryan, K. Kaupmann // *Trends in Pharmacological Sciences*. — 2005. Vol. 26, № 1. — P. 36–43.

135. Delli Pizzi, S. GABA content within the ventromedial prefrontal cortex is related to trait anxiety / S. Delli Pizzi, C. Padulo, A. Brancucci, G. Bubbico, R. A. Edden, A. Ferretti, R. Franciotti, V. Manippa, D. Marzoli, M. Onofrij, G. Sepede, A. Tartaro, L. Tommasi, S. Puglisi-Allegra, L. Bonanni // *Social Cognitive and Affective Neuroscience*. — 2015. — Vol. 11, № 5. — P. 758–766.
136. Delmas, S. Altered aspects of anxiety-related behavior in kisspeptin receptor-deleted male mice / S. Delmas, R. Porteous, D. H. Bergin, A. E. Herbison // *Scientific Reports*. — 2018. — Vol. 8, № 1. — 2794.
137. Desai, S. J. 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.
138. Deussing, J. M. Dissecting the genetic effect of the CRH system on anxiety and stress-related behaviour / J. Deussing, W. Wurst // *Comptes Rendus Biologies*. — 2005. — Vol. 328, № 2. — P. 199–212.
139. Díaz-Morán, S. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: Focus on freezing and grooming / S. Díaz-Morán, C. Estanislau, T. Ca, G. Blázquez, A. Ráez, A. Tobe, A. Fernández-Teruel // *World Journal of Neuroscience*. — 2014. — Vol. 4, № 1. — P. 1–11.
140. Djiogue, S. Royal Jelly Induced Anxiolytic Effects and Prevent Hot Flushes in a Menopausal Model on Wistar Rat / S. Djiogue // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. — 2019. — Vol. 19, № 5. — P. 14557-14566.
141. Donner, J. Support for involvement of glutamate decarboxylase 1 and neuropeptide y in anxiety susceptibility / J. Donner, T. Sipilä, S. Ripatti, L. Kananen, X. Chen, K. S. Kendler, J. Lönnqvist, S. Pirkola, J. M. Hetta, I. Hovatta // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. — 2012. — Vol. 159B, № 3. — P. 316–327.
142. Ebner, K. The role of substance P in stress and anxiety responses / K. Ebner, N. Singewald // *Amino Acids*. — 2006. — Vol. 31, № 3. — P. 251–272.
143. Erban, T. The Unique Protein Composition of Honey Revealed by Comprehensive Proteomic Analysis: Allergens, Venom-like Proteins, Antibacterial Properties, Royal Jelly Proteins, Serine Proteases, and Their Inhibitors / T. Erban, E. Shcherbachenko, P. Talacko,

- K. Harant // *Journal of Natural Products*. — 2019. — Vol. 82, № 5. — P. 1217–1226.
144. Erdős, E. G. Structure and functions of human angiotensin I converting enzyme (kininase II) / E. G. Erdős, R. A. Skidgel // *Biochemical Society Transactions*. — 1985. — Vol. 13, № 1. — P. 42–44.
145. Erejuwa, O. O. Honey: A Novel Antioxidant / O. O. Erejuwa, S. A. Sulaiman, M. S. Ab Wahab // *Molecules*. — 2012. — Vol. 17, № 4. — P. 4400–4423.
146. Escuredo, O. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon / O. Escuredo, I. Dobre, M. Fernández-González, M. C. Seijo // *Food Chemistry*. — 2014. — Vol. 149. P. 84–90. — P. 84–90.
147. Escuredo, O. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic Area / O. Escuredo, M. Míguez, M. Fernández-González, M. Carmen Seijo // *Food Chemistry*. — 2013. — Vol. 138, № 2–3. — P. 851–856.
148. Eser, D. Neuroactive Steroids as Endogenous Modulators of Anxiety / D. Eser, T. C. Baghai, C. Schüle, C. Nothdurfter, R. Rupprecht // *Current Pharmaceutical Design*. — 2008. — Vol. 14, № 33. — P. 3525–3533.
149. Fadzil, M. A. M. The Potential Use of Honey as a Neuroprotective Agent for the Management of Neurodegenerative Diseases / M. A. M. Fadzil, S. Mustar, A. A. Rashed // *Nutrients*. — 2023. — Vol. 15, № 7. — P. 1558.
150. Faita, M. R. Proteomic profiling of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. exposed to food containing herbicide-based glyphosate / M. R. Faita, A. Chaves, C. C. G. Corrêa, V. Silveira, R. O. Nodari // *Chemosphere*. — 2022. — Vol. 292. — P. 133334.
151. Fang, Y. Proteome Analysis Unravels Mechanism Underling the Embryogenesis of the Honeybee Drone and Its Divergence with the Worker (*Apis mellifera* *lingustica*) / Y. Fang, M. Feng, B. Han, Y. Qi, H. Hu, P. Fan, X. Huo, L. Meng, J. Li // *Journal of Proteome Research*. — 2015. — Vol. 14, № 9. — P. 4059–4071.
152. Faria, M. P. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: Role of CRF1 and NMDA receptors / M. P. Faria, T. T. Miguel, K. S. Gomes, R. L. Nunes-de-Souza // *Hormones and Behavior*. — 2016. — Vol. 79. — P. 74–83.
153. Felice, D. GABAB Receptors: Anxiety and Mood Disorders / D. Felice, J. F. Cryan, O. F. O’Leary // *Behavioral Neurobiology of GABAB Receptor Function*. — Springer Inter-

national Publishing, 2020. — P. 241–265.

154. Feng, M. Mechanistic Insight into Royal Protein Inhibiting the Gram-Positive Bacteria / M.Feng, Y. Fang, C. Ma, X. Duan, Y. Zhang, B. Han, H. Hu, L. Meng, F. Wang, J. Li // *Biomolecules*. — 2021. — Vol. 11, № 1. — P. 64.

155. Fernandez, S. P. Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion / S. P. Fernandez, P. Gaspar // *Neuropharmacology*. — 2012. — Vol. 62, № 1. — P. 144–154.

156. Filho, C. B. Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice / C. B. Filho // *European Journal of Pharmacology*. — 2016. — Vol. 791. — P. 284–296.

157. Fontana, R. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*) / R. Fontana, M. A. Mendes, B. M. de Souza, K. Konno, L. M. M. César, O. Malaspina, M. S. Palma // *Peptides*. — 2004. — Vol. 25, № 6. — P. 919–928.

158. Foster, J. A. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression / J. A. Foster, K.-A. McVey Neufeld // *Trends in Neurosciences*. — 2013. — Vol. 36, № 5. — P. 305–312.

159. Frazer, A. Norepinephrine involvement in antidepressant action // *The Journal of Clinical Psychiatry*. — 2000. — Vol. 61. — P. 25–30.

160. Fricker, L. D. Carboxypeptidase E // *Annual Review of Physiology*. — 1988. — Vol. 50, № 1. — P. 309–321.

161. Fricker, L. D. Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. / L. D. Fricker, S. H. Snyder // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1982. — Vol. 79, № 12. — P. 3886–3890.

162. Furusawa, T. Comprehensive Royal Jelly (RJ) Proteomics Using One- and Two-Dimensional Proteomics Platforms Reveals Novel RJ Proteins and Potential Phospho/Glycoproteins / T. Furusawa, R. Rakwal, H. Wook Nam, J. Shibato, G. K. Agrawal, Y. S. Kim, Y. Ogawa, Y. Yoshida, Y. Kouzuma, Y. Masuo, M. Yonekura // *Journal of Proteome Research*. — 2008. — Vol. 7, № 8. — P. 3194–3229.

163. Garay, R. The development of glutamate-based antidepressants is taking longer than

expected / R. Garay, C. A. Zarate, I. Cavero, Y.-K. Kim, T. Charpeaud, P. Skolnick // *Drug Discovery Today*. — 2018. — Vol. 23, № 10. — P. 1689–1692.

164. García-Bereguiaín, M. A. Hydrogen Sulfide Raises Cytosolic Calcium in Neurons Through Activation of L-Type Ca²⁺ Channels / M. A. García-Bereguiaín, A. K. Samhan-Arias, F. J. Martín-Romero, C. Gutiérrez-Merino // *Antioxidants & Redox Signaling*. — 2008. — Vol. 10, № 1. — P. 31–42.

165. Garcia-Garcia, A. L. Serotonin inputs to the dorsal BNST modulate anxiety in a 5-HT_{1A} receptor-dependent manner / A. L. Garcia-Garcia, S. Canetta, J. M. Stujenske, N. S. Burghardt, M. S. Ansorge, A. Dranovsky, E. D. Leonardo // *Molecular Psychiatry*. — 2017. — Vol. 23, № 10. — P. 1990–1997.

166. Gätschenberger, H. Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks / H. Gätschenberger, K. Azzami, J. Tautz, H. Beier // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8, № 6. — e66415.

167. Gavioli, E. C. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands / E. C. Gavioli, G. Calo' // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. — 2006. — Vol. 372, № 5. — P. 319–330.

168. Ghorbanpour, A. M. Combined effects of royal jelly and environmental enrichment against stress-induced cognitive and behavioral alterations in male rats: behavioral and molecular studies / A. M. Ghorbanpour, M. Saboor, R. Panahizadeh, H. Saadati, M. Dadkhah // *Nutritional Neuroscience*. — 2021. — Vol. 25, № 9. — P. 1860–1871.

169. Gibula-Bruzda, E. Enkephalin analog, cyclo[Nε,Nβ-carbonyl-D-Lys²,Dap⁵] enkephalinamide (cUENK6), inhibits the ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior in rats / E. Gibula-Bruzda, M. Marszalek-Grabska, E. Witkowska, J. Izdebski, J. H. Kotlinska // *Alcohol*. — 2015. — Vol. 49, № 3. — P. 229–236.

170. Gismondi, A. Royal jelly lipophilic fraction induces antiproliferative effects on SH-SY5Y human neuroblastoma cells / A. Gismondi, E. Trionfera, L. Canuti, G. Di Marco, A. Canini // *Oncology Reports*. — 2017. — Vol. 38, № 3. — P. 1833–1844.

171. Giusto, G. Pectin-honey hydrogel: Characterization, antimicrobial activity and biocompatibility / G. Giusto // *Bio-Medical Materials and Engineering*. — 2018. — Vol. 29, № 3. — P. 347–356.

172. Goekoop, J. G. Depression with above-normal plasma vasopressin: Validation by relations with family history of depression and mixed anxiety and retardation / J. G. Goekoop, R. P. F. de Winter, R. de Rijk, K. H. Zwinderman, A. Frankhuijzen-Sierevogel, V. M. Wiegant // *Psychiatry Research*. — 2006. — Vol. 141, № 2. — P. 201–211.
173. Gray, B. H. Antibacterial interactions between two monofloral honeys and several topical antiseptics, including essential oils / B. H. Gray, K. J. Green, R. R. Haines, K. A. Hammer // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. — 2022. — Vol. 22, № 1. — 228.
174. Green, K. J. Correlation of the antibacterial activity of commercial manuka and *Lepidospermum* honeys from Australia and New Zealand with methylglyoxal content and other physicochemical characteristics / K. J. Green, I. L. Lawag, C. Locher, K. A. Hammer // *PLoS ONE* — 2022. — Vol. 17, № 7. — e0272376.
175. Green, T. A. Differential effects of GABAA receptor activation in the prelimbic and orbitofrontal cortices on anxiety / T. A. Green, S. J. Baracz, N. A. Everett, K. J. Robinson, J. L. Cornish // *Psychopharmacology*. — 2020. — Vol. 237, № 11. — P. 3237–3247.
176. Guest, P. C. *Pre-Clinical Models. Techniques and Protocols*. — New York: Humana New York, 2018. — 356 p.
177. Guggenhuber, S. Impaired 2-AG Signaling in Hippocampal Glutamatergic Neurons: Aggravation of Anxiety-Like Behavior and Unaltered Seizure Susceptibility / S. Guggenhuber, H. Romo-Parra, L. Bindila, J. Leschik, E. Lomazzo, F. Remmers, T. Zimmermann, R. Lerner, M. Klugmann, H.-C. Pape, B. Lutz // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. — 2015. — Vol. 19, № 2. — P. pyv091.
178. Guiné, R. P. F. Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Broods: Composition, Technology and Gastronomic Applicability / R. P. F. Guiné, S. G. Florença, P. M. R. Correia, O. Anjos, C. Coelho, C. A. Costa // *Foods*. — 2022. — Vol. 11, № 18. — P. 2750.
179. Gulati, K. Differential neuromodulatory role of NO in anxiety and seizures: an experimental study / K. Gulati, A. Ray // *Nitric Oxide*. — 2014. — Vol. 43. — P. 55–61.
180. Guo, N. Comparison of the Chemical Composition and Biological Activity of Mature and Immature Honey: An HPLC/QTOF/MS-Based Metabolomic Approach / N. Guo, L. Zhao, Y. Zhao, Q. Li, X. Xue, L. Wu, M. G. Escalada, K. Wang, W. Peng // *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry. — 2020. — Vol. 68, № 13. — P. 4062–4071.

181. Hale, M. W. Integrative physiology of depression and antidepressant drug action: Implications for serotonergic mechanisms of action and novel therapeutic strategies for treatment of depression / M. W. Hale, C. L. Raison, C. A. Lowry // *Pharmacology & Therapeutics*. — 2013. — Vol. 137, № 1. — P. 108–118.

182. Hale, M. W. Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders / M. W. Hale, A. Shekhar, C. A. Lowry // *Cellular and Molecular Neurobiology*. — 2012. — Vol. 32, № 5. — P. 695–708.

183. Han, B. Novel Royal Jelly Proteins Identified by Gel-Based and Gel-free Proteomics / B. Han, C. Li, L. Zhang, Y. Fang, M. Feng, J. Li // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2011. — Vol. 59, № 18. — P. 10346–10355.

184. Han, Y. Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats / Y. Han, J. Qin, X. Chang, Z. Yang, D. Bu, J. Du // *Neuroscience Research*. — 2005. — Vol. 53, № 2. — P. 216–219.

185. Hannestad, J. O. Changes in the Cholinergic System between Bipolar Depression and Euthymia as Measured with [123I]5IA Single Photon Emission Computed Tomography / J. O. Hannestad, K. P. Cosgrove, N. F. DellaGioia, E. Perkins, F. Bois, Z. Bhagwagar, J. P. Seibyl, T. D. McClure-Begley, M. R. Picciotto, I. Esterlis // *Biological Psychiatry*. — 2013. — Vol. 74, № 10. — P. 768–776.

186. Hareendran, S. Carboxypeptidase E and its splice variants: Key regulators of growth and metastasis in multiple cancer types / S. Hareendran, X. Yang, V. K. Sharma, Y. P. Loh // *Cancer Letters*. — 2022. — Vol. 548. — P. 215882.

187. Häring, M. Circuit Specific Functions of Cannabinoid CB1 Receptor in the Balance of Investigatory Drive and Exploration / M. Häring, N. Kaiser, K. Monory, B. Lutz // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6, № 11. — e26617.

188. Harvey, A. R. Expression of messenger RNAs for glutamic acid decarboxylase, preprotachykinin, cholecystokinin, somatostatin, proenkephalin and neuropeptide Y in the adult rat superior colliculus / A. R. Harvey, R. P. Heavens, L. A. Yellachich, D. J. Sirinathsinghji // *Neuroscience*. — 2001. — Vol. 103, № 2. — P. 443–455.

189. Harwood, G. Social immunity in honey bees: royal jelly as a vehicle in transferring

bacterial pathogen fragments between nestmates / G. Harwood, H. Salmela, D. Freitak, G. Amdam // *Journal of Experimental Biology*. — 2021. — Vol. 224, № 7. — jeb231076

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

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

192. Henrique, A. J. Non-pharmacological interventions during childbirth for pain relief, anxiety, and neuroendocrine stress parameters: A randomized controlled trial / A. J. Henrique, M. C. Gabrielloni, P. Rodney, M. Barbieri // *International Journal of Nursing Practice*. — 2018. — Vol. 24, № 3. — e12642.

193. Hernández-Vázquez F. GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus / F. Hernández-Vázquez, J. Garduño, S. Hernández-López // *Reviews in the Neurosciences*. — 2018. — Vol. 30, № 3. — P. 289–303.

194. Heydari, B. Low pregnenolone sulphate plasma concentrations in patients with generalized social phobia / B. Heydari, J.-M. Le Melleo // *Psychological Medicine*. — 2002. — Vol. 32, № 05. — P. 929-933

195. Hill, M. The Endocannabinoid System and the Treatment of Mood and Anxiety Disorders / M. Hill, B. Gorzalka // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. — 2009. — Vol. 8, № 6. — P. 451–458.

196. Holmes, A. Galanin GAL-R1 Receptor Null Mutant Mice Display Increased Anxiety-Like Behavior Specific to the Elevated Plus-Maze / A. Holmes, J. W. Kinney, C. C. Wrenn, Q. Li, R. J. Yang, L. Ma, J. Vishwanath, M. C. Saavedra, C. E. Innerfield, A. S. Jacoby, J. Shine, T. P. Iismaa, J. N. Crawley // *Neuropsychopharmacology*. — 2003. — Vol. 28, № 6. — P. 1031–1044.

197. Holsboer, F. *Anxiety and Anxiolytic Drugs*. / F. Holsboer, A. Ströhle. — Springer, 2005. — 580 p.

198. Holstege, G. Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat / G. Holstege, L. Meiners, K. Tan // *Ex-*

perimental Brain Research. — 1985. — Vol. 58, № 2. — P. 379–391.

199. ICD-11: [сайт]. — URL: <https://icd.who.int/ru> (дата обращения: 23.05.2023). —

Текст: электронный

200. Iegaki, N. Royal jelly reduces depression-like behavior through possible effects on adrenal steroidogenesis in a murine model of unpredictable chronic mild stress / N. Iegaki, Y. Narita, N. Hattori, Y. Hirata, K. Ichihara // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. — 2020. — Vol. 84, № 3. — P. 606–612.

201. Iftikhar, K. Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders / K. Iftikhar, A. Siddiq, S. G. Baig, S. Zehra // *Neuropeptides*. — 2020. — Vol. 79. — 101993.

202. Information on EC 3.4.15.1 - peptidyl-dipeptidase A [сайт]. — URL: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.15.1> (дата обращения 28.05.2023). — Текст: электронный

203. Information on EC 3.4.17.10 - carboxypeptidase E [сайт]. — URL: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.17.10> (дата обращения: 28.05.2023). — Текст: электронный

204. Isidorov, V. A. GC-MS investigation of the chemical composition of honeybee drone and queen larvae homogenate / V. A. Isidorov, S. Bakier, M. Stocki // *Journal of Apicultural Science*. — 2016. — Vol. 60, № 1. — P. 111–120.

205. Israili, Z. H. Antimicrobial Properties of Honey // *American Journal of Therapeutics*. — 2014. — Vol. 21, № 4. — P. 304–323.

206. Ito, S. Antidepressant-Like Activity of 10-Hydroxy-Trans-2-Decenoic Acid, a Unique Unsaturated Fatty Acid of Royal Jelly, in Stress-Inducible Depression-Like Mouse Model / S. Ito, Y. Nitta, H. Fukumitsu, H. Soumiya, K. Ikeno, T. Nakamura, S. Furukawa // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. — 2012. — Vol. 2012. — P. 1–6.

207. Itoi, K. The Brainstem Noradrenergic Systems in Stress, Anxiety and Depression / K. Itoi, N. Sugimoto // *Journal of Neuroendocrinology*. — 2010. — Vol. 22, № 5. — P. 355–361.

208. Jacob, W. Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the

test aversiveness: role of glutamatergic transmission / W. Jacob, A. Yassouridis, G. Marsicano, K. Monory, B. Lutz, C. T. Wotjak // *Genes, Brain and Behavior*. — Vol. 8, № 7. — P. 685–698.

209. Jarrott, B. Altered levels of neuropeptides in the medulla and spinal cord of spontaneously hypertensive rats / B. Jarrott, S. J. Lewis, C. Maccarrone, A. Shulkes // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. — Vol. 15, № 2. — P. 157–162.

210. Ji, L. Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease / L. Ji, H.-T. Wu, X.-Y. Qin, R. Lan // *Endocrine Connections*. — 2017. — Vol. 6, № 4. — P. 18–38.

211. Jia, F. The effect of halogenation on the antimicrobial activity, antibiofilm activity, cytotoxicity and proteolytic stability of the antimicrobial peptide Jelleine-I / F. Jia, Yi. Zhang, J. Wang, J. Peng, P. Zhao, L. Zhang, H. Yao, J. Ni, K. Wang // *Peptides*. — 2019. — Vol. 112. — P. 56–66.

212. Jie, H. Amino acid composition of royal jelly harvested at different times after larval transfer / H. Jie, P. M. Li, G. J. Zhao, X. L. Feng, D. J. Zeng, C. L. Zhang, M. Y. Lei, M. Yu, Q. Chen // *Genetics and Molecular Research*. — 2016. — Vol. 15, № 3. — P. 1-10.

213. Johnson, P. L. A key role for orexin in panic anxiety / P. L. Johnson, W. Truitt, S. D. Fitz, P. E. Minick, A. Dietrich, S. Sanghani, L. Träskman-Bendz, A. W. Goddard, L. Brundin, A. Shekhar // *Nature Medicine*. — 2009. — Vol. 16, № 1. — P. 111–115.

214. Johnson, P. L. Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning / P. L. Johnson, A. Molosh, S. D. Fitz, D. Arendt, G. A. Deehan, L. M. Federici, C. Bernabe, E. A. Engleman, Z. A. Rodd, C. A. Lowry, A. Shekhar // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. — 2015. — Vol. 138. — P. 174–179.

215. Junot, C. RXP 407, a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks in vivo the degradation of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis / C. Junot, M.-F. Gonzales, E. Ezan, J. Cotton, G. Vazeux, A. Michaud, M. Azizi, S. Vassiliou, A. Yiotakis, P. Corvol, V. Dive // *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. — 2001. — Vol. 297, № 2. — P. 606-611.

216. Juruena, M. F. The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety / M. F. Juru-

ena, F. Eror, A. J. Cleare, A. H. Young // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. — 2020. — Vol. 1191. — P. 141–153.

217. Kalinin, V. Anxiety Disorders - The New Achievements / V. Kalinin, C. Hocaoglu, S. Mohamed // *IntechOpen*, 2021. — 208 p.

218. Kalk, N. The role of central noradrenergic dysregulation in anxiety disorders: evidence from clinical studies / N. Kalk, D. Nutt, A. Lingford-Hughes // *Journal of Psychopharmacology*. — 2010. — Vol. 25, № 1. — P. 3–16.

219. Kalueff, A. V. Role of GABA in anxiety and depression / A. V. Kalueff, D. J. Nutt // *Depression and Anxiety*. — 2007. — Vol. 24, № 7. — P. 495–517.

220. Kamat, P. K. Role of Hydrogen Sulfide in Brain Synaptic Remodeling / P. K. Kamat, A. Kalani, N. Tyagi // *Methods in Enzymology*. — 2015. — Vol. 555 — P. 207–229.

221. Kang, X. Hydrogen sulfide antagonizes sleep deprivation-induced depression- and anxiety-like behaviors by inhibiting neuroinflammation in a hippocampal Sirt1-dependent manner / X. Kang, L. Jiang, F. Lan, Y.-Y. Tang, P. Zhang, W. Zou, Y.-J. Chen., X.-Q. Tang // *Brain Research Bulletin*. — 2021. — Vol. 177. — P. 194–202.

222. Kastin, A. J. Kastin. Handbook of Biologically Active Peptides / A. J. Kastin. Elsevier, 2013. — 2032 p.

223. Kerr, D. S. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism / D. S. Kerr, L. R. M. Bevilaqua, J. S. Bonini, J. I. Rossato, C. A. Köhler, J. H. Medina, I. Izquierdo, M. Cammarota // *Psychopharmacology*. — 2004. — Vol. 179, № 3. — P. 529–535.

224. Keszler, G. Association between anxiety and non-coding genetic variants of the galanin neuropeptide / G. Keszler, Z. Molnár, Z. Rónai, M. Sasvári-Székely, A. Székely, E. Kótyuk // *PLoS ONE* — 2019. — Vol. 14, № 12. — e0226228.

225. Khalil, A. T. Synergistic antibacterial effect of honey and Herba Ocimi Basilici against some bacterial pathogens / A. T. Khalil, I. Khan, K. Ahmad, Y. A. Khan, M. Khan, M. J. Khan // *Journal of Traditional Chinese Medicine*. — 2013. — Vol. 33, № 6. — P. 810–814.

226. Khan, R. U. Towards a better understanding of the therapeutic applications and corresponding mechanisms of action of honey / R. U. Khan, S. Naz, A. M. Abudabos // *Envi-*

- ronmental Science and Pollution Research. — 2017. — Vol. 24, № 36. — P. 27755–27766.
- 227.** Khazaei, M. New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review / M. Khazaei, A. Ansarian, E. Ghanbari // *Journal of Dietary Supplements*. — 2017. — Vol. 15, № 5. — P. 757–775.
- 228.** Kim, H.-J. Carboxypeptidase E Is a Novel Modulator of RANKL-Induced Osteoclast Differentiation / H.-J. Kim, J. Hong, H.-J. Yoon, Y.-R. Yoon, S.-Y. Kim // *Molecules and Cells*. — 2014. — Vol. 37, № 9. — P. 685–690.
- 229.** Kitada, Y. Effects of antidepressants in the rat forced swimming test / Y. Kitada, T. Miyauchi, A. Satoh, S. Satoh // *European Journal of Pharmacology*. — 1981. — Vol. 72, № 2–3. — P. 145–152.
- 230.** Kocot, J. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application / J. Kocot, M. Kielczykowska, D. Luchowska-Kocot, J. Kurzepa, I. Musik // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. — 2018. — Vol. 2018. — P. 1–29.
- 231.** Kodai, T. Compositions of Royal Jelly II. Organic Acid Glycosides and Sterols of the Royal Jelly of Honeybees (*Apis mellifera*) / T. Kodai, K. Umebayashi, T. Nakatani, K. Ishiyama, N. Noda // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. — 2007. — Vol. 55, № 10. — P. 1528–1531.
- 232.** Kokare, D. M. Interaction between neuropeptide Y and alpha-melanocyte stimulating hormone in amygdala regulates anxiety in rats / D. M. Kokare, M. P. Dandekar, C. T. Chopde, N. Subhedar // *Brain Research*. — 2005. — Vol. 1043, № 1–2. — P. 107–114.
- 233.** Kokhan, V. S. Neurokinin-1 receptor antagonist rolapitant suppresses anxiety and alcohol intake produced by repeated withdrawal episodes / V. S. Kokhan, P. K. Anokhin, D. A. Abaimov, I. Y. Shamakina, V. O. Soldatov, A. V. Deykin // *The FEBS Journal*. — 2022. — Vol. 289, № 16. — P. 5021–5029.
- 234.** Kõks, S. A screen for genes induced in the amygdaloid area during cat odor exposure / S. Kõks, H. Luuk, A. Nelovkov, T. Areda, E. Vasar // *Genes, Brain and Behavior*. — 2004. — Vol. 3, № 2. — P. 80–89.
- 235.** 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.

236. Kunugi, M. A. Royal Jelly and Its Components Promote Healthy Aging and Longevity: From Animal Models to Humans / M. A. Kunugi // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20, № 19. — P. 4662.

237. Kupcova, I. Anxiety and Depression: What Do We Know of Neuropeptides? / I. Kupcova, L. Danisovic, I. Grgac, S. Harsanyi // *Behavioral Sciences*. — 2022. — Vol. 12, № 8. — P. 262.

238. Kutlu, M. G. Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders / M. G. Kultu, T. J. Gould // *Biochemical Pharmacology*. — 2015. — Vol. 97, № 4. — P. 498–511.

239. Lai, C.-C. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic / C.-C. Lai, S. Y. Chen, W. C. Ko, P. R. Hsueh // *International Journal of Antimicrobial Agents*. — 2021. — Vol. 57, № 4. — P. 106324.

240. Lee, D. S. Honey and Wound Healing / D. S. Lee, S. Sinno, A. Khachemoune // *American Journal of Clinical Dermatology*. — 2011. — Vol. 12, № 3. — P. 181–190.

241. Leiva-Sabadini, C. Antibacterial Effect of Honey-Derived Exosomes Containing Antimicrobial Peptides Against Oral Streptococci / C. Leiva-Sabadini, S. Alvarez, N. P. Barrera, C. M. A. P. Schuh, S. Aguayo // *International Journal of Nanomedicine*. — 2021. — Vol. 16. — P. 4891–4900.

242. Leshan, R. L. Ventral Tegmental Area Leptin Receptor Neurons Specifically Project to and Regulate Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript Neurons of the Extended Central Amygdala / R. L. Leshan, D. M. Opland, G. W. Louis, G. M. Leininger, C. M. Patterson, C. J. Rhodes, H. Münzberg, M. G. Myers Jr // *The Journal of Neuroscience*. — 2010. — Vol. 30, № 16. — P. 5713–5723.

243. Li, J. Honeybee (*Apis mellifera ligustica*) drone embryo proteomes / J. Li, Y. Fang, L. Zhang, D. Begna // *Journal of Insect Physiology*. — 2011. — Vol. 57, № 3. — P. 372–384.

244. Li, N. Carboxypeptidase E Regulates Activity-Dependent TrkB Neuronal Surface Insertion and Hippocampal Memory / N. Li, S. W. Teng, L. Zhao, J. R. Li, J. L. Xu,

J. C. Shuai, Z. Y. Chen // *The Journal of Neuroscience*. — 2021. — Vol. 41, № 33. — P. 6987–7002.

245. Li, Y. Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats / Y. Li, S. Li, C. Wei, H. Wang, N. Sui, G. J. Kirouac // *Psychopharmacology*. — 2010. — Vol. 212, № 2. — P. 251–265.

246. Liang, H.-Y. nNOS-expressing neurons in the vmPFC transform pPVT-derived chronic pain signals into anxiety behaviors / H. Y. Liang, Z. J. Chen, H. Xiao, Y. H. Lin, Y. Y. Hu, L. Chang, H.-Y. Wu, P. Wang, W. Lu, D.-Y. Zhu, C.-X. Luo // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11, № 1. — 2501.

247. Lin, L. C. Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality / L. C. Lin, E. Sibille // *Molecular Psychiatry*. — 2015. — Vol. 20, № 3. — P. 377–387.

248. Liu, F. Nitric oxide inhibitory daphnane diterpenoids as potential anti-neuroinflammatory agents for AD from the twigs of *Trigonostemon thyrsoideus* / F. Liu, X. Yang, J. Ma, Y. Yang, C. Xie, M. Tuerhong, D. Q. Jin, J. Xu, D. Lee, Y. Ohizumi, Y. Guo // *Bioorganic Chemistry*. — 2017. — Vol. 75. — P. 149–156.

249. Liu, W.-Z. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety / W. Z. Liu, W. H. Zhang, Z. H. Zheng, J. X. Zou, X. X. Liu, S. H. Huang, W. J. You, Y. He, J. Y. Zhang, X.-D. Wang, B.-X. Pan // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11, № 1. — 2221.

250. Longone, P. The complex roles of neurosteroids in depression and anxiety disorders / P. Longone, R. Rupprecht, G. A. Manieri, G. Bernardi, E. Romeo, A. Pasini // *Neurochemistry International*. — 2008. — Vol. 52, № 4–5. — P. 596–601.

251. 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

252. Lungwitz, E. A. Orexin-A induces anxiety-like behavior through interactions with glutamatergic receptors in the bed nucleus of the stria terminalis of rats / E. A. Lungwitz, A. Molosh, P. L. Johnson, B. P. Harvey // *Physiology & Behavior*. — 2012. — Vol. 107, № 5. — P. 726–732.

253. Lutz, B. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress /

B. Lutz, G. Marsicano, R. Maldonado, C. J. Hillard // *Nature Reviews Neuroscience*. — 2015. — Vol. 16, № 12. — P. 705–718.

254. Ma, B. Revealing phosphorylation regulatory networks during embryogenesis of honey bee worker and drone (*Apis mellifera*) / B. Ma, C. Ma, J. Li, Y. Fang // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2022. — Vol. 10.

255. Ma, C. Changes in chemical composition and antioxidant activity of royal jelly produced at different floral periods during migratory beekeeping / C. Ma, B. Ma, J. Li, Y. Fang // *Food Research International*. — 2022. — Vol. 155. — 111091.

256. MacGowan, A. Antibiotic resistance / A. MacGowan, E. Macnaughton // *Medicine*. — 2017. — Vol. 45, № 10. — P. 622–628.

257. Majtan, J. Vitamin C Enhances the Antibacterial Activity of Honey against Planktonic and Biofilm-Embedded Bacteria / J. Majtan, M. Sojka, H. Palenikova, M. Bucekova, V. Majtan // *Molecules*. — 2020. — Vol. 25, № 4. — P. 992.

258. Maleszka, R. Analysis of *Drosophila* yellow-B cDNA Reveals a New Family of Proteins Related to the Royal Jelly Proteins in the Honeybee and to an Orphan Protein in an Unusual Bacterium *Deinococcus radiodurans* / R. Maleszka, R. Kucharski // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2000. — Vol. 270, № 3. — P. 773–776.

259. Mandal, M. D. Honey: its medicinal property and antibacterial activity / M. D. Mandal, S. Mandal // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. — 2011. — Vol. 1, № 2. — P. 154–160.

260. Marcinkiewicz, C. A. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala / C. A. Marcinkiewicz, C. M. Mazzone, G. D'Agostino, L. R. Halladay, J. A. Hardaway, J. F. DiBerto // *Nature*. — 2016. — Vol. 537, № 7618. — P. 97–101.

261. Mark, G.P. Cholinergic modulation of mesolimbic dopamine function and reward / G. P. Mark, S. Shabani, L. K. Dobbs, S. T. Hansen // *Physiology & Behavior*. — 2011. — Vol. 104, № 1. — P. 76–81.

262. Marrocco, J. Anxiety-Like Behavior of Prenatally Stressed Rats Is Associated with a Selective Reduction of Glutamate Release in the Ventral Hippocampus / J. Marrocco, J. Mairesse, R. T. Ngomba, V. Silletti, G. Van Camp, H. Bouwalerh, M. Summa // *The Journal of Neuroscience*. — 2012. — Vol. 32, № 48. — P. 17143–17154.

263. Martínez-Chacón, G. Neuroprotective properties of queen bee acid by autophagy induction / G. Martínez-Chacón, M. Paredes-Barquero, S. M. S. Yakhine-Diop, E. Uribe-Carretero // *Cell Biology and Toxicology*. — 2021. — Vol. 39. — P. 751–770.
264. Marzban, L. Role of Carboxypeptidase E in Processing of Pro-Islet Amyloid Polypeptide in β -Cells / L. Marzaban, G. Soukhatcheva, C. B. Verchere // *Endocrinology*. —, 2005. — Vol. 146, № 4. — P. 1808–1817.
265. Mato, I. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection / I. Mato, J. F. Huidobro, J. Simal-Lozano // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2006. — Vol. 54, № 5. — P. 1541–1550.
266. Mattei, S. Structure of native glycolipoprotein filaments in honeybee royal jelly / S. Mattei, A. Ban, A. Piconi, M. Leibundgut, R. Glockshuber, D. Boehringer // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11, № 1. — 6267.
267. Matuszewska, E. Mining the Royal Jelly Proteins: Combinatorial Hexapeptide Ligand Library Significantly Improves the MS-Based Proteomic Identification in Complex Biological Samples / E. Matuszewska, J. Matysiak, G. Rosiński, E. Kędzia, W. Ząbek, J. Zawadziński, J. Matysiak // *Molecules*. — 2021. — Vol. 26, № 9. — 2762.
268. Medeiros, K. A. A. L. Involvement of nitric oxide in the neurobiology of fear-like behavior / K. A. A. L. Medeiros, T. H. Almeida-Souza, R. S. Silva // *Nitric Oxide*. — 2022. — Vol. 124. — P. 24–31.
269. Mei, L. Acetylcholine Muscarinic Receptors in Ventral Hippocampus Modulate Stress-Induced Anxiety-Like Behaviors in Mice / L. Mei, Y. Zhou, Y. Sun, H. Liu, D. Zhang, P. Liu, H. Shu // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. — 2020. — Vol. 13.
270. Melo, I. Enkephalin knockout male mice are resistant to chronic mild stress / I. Melo, E. Drews, A. Zimmer, A. Bilkei-Gorzo // *Genes, Brain and Behavior*. — 2014. — Vol. 13, № 6. — P. 550–558.
271. Merabet, L. Dose-dependent inhibitory effects of angiotensin II on visual responses of the rat superior colliculus: AT1 and AT2 receptor contributions / L. Merabet, M. de Gasparo, C. Casanova // *Neuropeptides*. — 1997. — Vol. 31, № 5. — P. 469–481.
272. Mineur, Y. S. The role of acetylcholine in negative encoding bias: Too much of a

good thing? / Y. S. Mineur, M. R. Picciotto // *European Journal of Neuroscience*. — 2019. — Vol. 53, № 1. — P. 114–125.

273. Modi, S. Glutamate level in anterior cingulate predicts anxiety in healthy humans: A magnetic resonance spectroscopy study / S. Modi, P. Rana, P. Kaur, N. Rani, S. Khushu // *Psychiatry Research: Neuroimaging*. — 2014. — Vol. 224, № 1. — P. 34–41.

274. Mòdol, L. Alteration of neonatal Allopregnanolone levels affects exploration, anxiety, aversive learning and adult behavioural response to intrahippocampal neurosteroids / L. Mòdol, S. Darbra, M. Vallèe, M. Pallarès // *Behavioural Brain Research*. — 2013. — Vol. 241. — P. 96–104.

275. Möhler, H. GABA_AReceptors in Central Nervous System Disease: Anxiety, Epilepsy, and Insomnia / H. Möhler // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. — 2006. — Vol. 26, № 5–6. — P. 731–740.

276. Möhler, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential / H. Möhler // *Neuropharmacology*. — 2012. — Vol. 62, № 1. — P. 42–53.

277. Monzón, M. E., Varas M.M., De Barioglio S.R. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain / M. E. Monzon, M. M. Varas, S. R. De Barioglio // *Peptides*. — 2001. — Vol. 22, № 7. — P. 1043–1047.

278. Mora, de la M. P. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis / M. P. de la Mora, A. Gallegos-Cari // *Progress in Neurobiology*. — 2010. — Vol. 90, № 2. — P. 198–216.

279. Moraes, C. L. K., Bertoglio L.J., Carobrez A.P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze / C. L. K. Moraes, L. J. Bertoglio, A. P. Carobrez // *Behavioural Brain Research*. — 2008. — Vol. 194, № 2. — P. 181–186.

280. Mosienko, V. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin / V. Mosienko, B. Bert, D. Beis, S. Matthes, H. Fink, M. Bader, N. Alenina // *Translational Psychiatry*. — 2012. — Vol. 2, № 5. — e122.

281. 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.

282. Musazzi, L. Stress, glucocorticoids and glutamate release: Effects of antidepressant drugs / L. Musazzi, G. Racagni, M. Popoli // *Neurochemistry International*. — 2011. — Vol. 59, № 2. — P. 138–149.

283. Muscat, R. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: A methodological analysis / R. Muscat, P. Willner // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. — 1992. — Vol. 16, № 4. — P. 507–517.

284. Näslund, J. Differences in Anxiety-Like Behavior within a Batch of Wistar Rats Are Associated with Differences in Serotonergic Transmission, Enhanced by Acute SRI Administration, and Abolished By Serotonin Depletion / J. Näslund, E. Studer, R. Pettersson, M. Hagsäter, S. Nilsson, H. Nissbrandt, E. Eriksson // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. — 2015. — Vol. 18, № 8.

285. Nemeroff, C. B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders / C. B. Nemeroff // *Psychopharmacology bulletin*. — 2003. — Vol. 37, №4. — P. 133-146.

286. Neugebauer, V. Amygdala, neuropeptides, and chronic pain-related affective behaviors / V. Neugebauer, M. Mazzitelli, B. Cragg, G. Ji // *Neuropharmacology*. — 2020. — Vol. 170. — 108052.

287. Neumann, I. D. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors / I. D. Neumann, R. Landgraf // *Trends in Neurosciences*. — 2012. — Vol. 35, № 11. — P. 649–659.

288. NeuroPedia: Neuropeptide database and spectra library [сайт]. — URL: <http://proteomics.ucsd.edu/Software/NeuroPedia/> (дата обращения: 25.05.2023). — Текст: электронный

289. Nguyen, C. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety / C. Nguyen, S. Mondoloni, T. L. Borgne, I. Centeno, M. Come, J. Jehl, C. Solié, L. M. Reynolds // *Neuron*. — 2021. — Vol. 109, № 16. — P. 2604-2615.e9.

290. Nguyen, T. T. Chronic Royal Jelly Administration Induced Antidepressant-Like Effects Through Increased Sirtuin1 and Oxidative Phosphorylation Protein Expression in the Amygdala of Mice / T. T. Nguyen, Y. Kambe, A. Miyata // *Current Molecular Pharmacol-*

ogy. — 2021. — Vol. 14, №2. — P. 115-122.

291. O'Farrell C. Formulation of an antibacterial topical cream containing bioengineered honey that generates reactive oxygen species / C. O'Farrell, T. J. Hall, L. M. Grover, S. C. Cox // *Biomaterials Advances*. — 2022. — Vol. 133. — 112664.

292. Oba, R. The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid β -peptide / R. Oba, A. Igarashi, M. Kamata, K. Nagata, S. Takano, H. Nakagawa // *European Journal of Neuroscience*. — 2005. — Vol. 21, № 3. — P. 733–740.

293. Odeh, F. The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats / F. Odeh, M. Antal // *European Journal of Neuroscience*. — 2001. — Vol. 14, № 8. — P. 1275–1286.

294. Ohmura, Y., The Roles of Corticotropin Releasing Factor (CRF) in Responses to Emotional Stress: Is CRF Release a Cause or Result of Fear/Anxiety? / Y. Ohmura, M. Yoshioka // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. — 2009. — Vol. 8, № 6. — P. 459–469.

295. Othman, Z. Potential Role of Honey in Learning and Memory / Z. Othman, R. Zakaria, N. H. N. Hussain, A. Hassan, N. Shafin, B. Al-Rahbi, A. H. Ahmad // *Medical Sciences*. — 2015. — Vol. 3, № 2. — P. 3–15.

296. Otręba, M. Bee Venom, Honey, and Royal Jelly in the Treatment of Bacterial Infections of the Oral Cavity: A Review / M. Otręba, Ł. Marek, N. Tyczyńska, J. Stojko, A. Rzepecka-Stojko // *Life*. — 2021. — Vol. 11, № 12. — P. 1311.

297. Ozmen, S. Ghrelin and leptin levels in children with anxiety disorders / S. Ozmen, A. Şeker, E. Demirci // *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. — 2019. — Vol. 32, № 10. — P. 1043–1047.

298. Ozsoy, S. The Effects of Antidepressants on Neuropeptide Y in Patients with Depression and Anxiety / S. Ozsoy, O. O. Eker, U. Abdulrezzak // *Pharmacopsychiatry*. — 2016. — Vol. 49, № 01. — P. 26–31.

299. P12821 · ACE_HUMAN [сайт]. — URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12821/entry> (дата обращения: 28.05.2023). — Текст: электронный

- 300.** P16870 · CBPE_HUMAN [сайт]. — URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16870/entry> (дата обращения: 28.05.2023). — Текст: электронный
- 301.** Pałasz, A., Menezes I.C., Worthington J.J. The role of brain gaseous neurotransmitters in anxiety / A. Pałasz, I. C. Menezes, J. J. Worthington // *Pharmacological Reports*. — 2021. — Vol. 73, № 2. — P. 357–371.
- 302.** Palotai, M. Orexin A-induced anxiety-like behavior is mediated through GABA-ergic, α - and β -adrenergic neurotransmissions in mice / M. Palotai, G. Telegdy, M. Jászberényi // *Peptides*. — 2014. — Vol. 57. — P. 129–134.
- 303.** Pape, H.-C. Neuropeptide S: A transmitter system in the brain regulating fear and anxiety / H.-C. Pape, K. Jüngling, T. Seidenbecher, J. Lesting // *Neuropharmacology*. — 2010. — Vol. 58, № 1. — P. 29–34.
- 304.** Pellow, S. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, M. Briley // *Journal of Neuroscience Methods*. — 1985. — Vol. 14, № 3. — P. 149–167.
- 305.** Picciotto, M. R. Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: A potential pathway to modulate aggression and related behavioral states / M. R. Picciotto, A. S. Lewis, G. I. van Schalkwyk // *Neuropharmacology*. — 2015. — Vol. 96. — P. 235–243.
- 306.** Pitsikas, N. The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety. Lights and shadows / N. Pitsikas // *Nitric Oxide*. — 2018. — Vol. 77. — P. 6–11.
- 307.** Pollack, M. H. High-field MRS study of GABA, glutamate and glutamine in social anxiety disorder: Response to treatment with levetiracetam / M. H. Pollack, J. E. Jensen, N. M. Simon, R. E. Kaufman // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. — 2008. — Vol. 32, № 3. — P. 739–743.
- 308.** Pollack, M. H. The Selective GABA Reuptake Inhibitor Tiagabine for the Treatment of Generalized Anxiety Disorder / M. H. Pollack, P. P. Roy-Byrne, M. Van Ameringen, H. Snyder, C. Brown, J. Ondrasik, K. Rickels // *The Journal of Clinical Psychiatry*. — 2005. — Vol. 66, № 11. — P. 1401–1408.
- 309.** Pomrenze, M. B. A Corticotropin Releasing Factor Network in the Extended Amyg-

dala for Anxiety / M. B. Pomrenze, J. Tovar-Diaz, A. Blasio, R. Maiya, S. M. Giovanetti, K. Lei, H. Morikawa, F. W. Hopf // *The Journal of Neuroscience*. — 2018. — Vol. 39, № 6. — P. 1030–1043.

310. Poulin, J.-F. Enkephalin knockdown in the central amygdala nucleus reduces unconditioned fear and anxiety / J.-F. Poulin, P. Bérubé, S. Laforest, G. Drolet // *European Journal of Neuroscience*. — 2013. — Vol. 37, № 8. — P. 1357–1367.

311. Pum, M. E., The role of cortical serotonin in anxiety and locomotor activity in Wistar rats / M. E. Pum, J. P. Huston, C. P. Müller // *Behavioral Neuroscience*. — 2009. — Vol. 123, № 2. — P. 449–454.

312. Pyrzanowska, J. Long-term administration of Greek Royal Jelly decreases GABA concentration in the striatum and hypothalamus of naturally aged Wistar male rats / J. Pyrzanowska, A. Wawer, I. Joniec-Maciejak // *Neuroscience Letters*. — 2018. — Vol. 675. — P. 17–22.

313. Pyrzanowska, J. Long-term administration of Greek Royal Jelly improves spatial memory and influences the concentration of brain neurotransmitters in naturally aged Wistar male rats / J. Pyrzanowska, A. Piechal, K. Blecharz-Klin // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2014. — Vol. 155, № 1. — P. 343–351.

314. Qin, X. GABAA(δ) receptor hypofunction in the amygdala-hippocampal circuit underlies stress-induced anxiety / X. Qin, H. Q. Pan, S. H. Huang, J. X. Zou, Z. H. Zheng, X. X. Liu // *Science Bulletin*. — 2022. — Vol. 67, № 1. — P. 97–110.

315. Quast, C. Gender-specific association of variants in the AKR1C1 gene with dimensional anxiety in patients with panic disorder: additional evidence for the importance of neurosteroids in anxiety? / C. Quast, A. Reif, T. Brückl, H. Pfister, H. Weber, M. Mattheisen, S. Cichon, T. Lang, A. Hamm // *Depression and Anxiety*. — 2014. — Vol. 31, № 10. — P. 843–850.

316. Rafiee Sardooi, A. Protective effect of honey on learning and memory impairment, depression and neurodegeneration induced by chronic unpredictable mild stress / A. Rafiee Sardooi, P. Reisi, A. Yazdi // *Physiology and Pharmacology*. — 2020. — Vol. 25, № 1. — P. 21–35.

317. Rajeswari, T. Antibacterial activity of honey against *Staphylococcus aureus* from in-

fectured wounds / T. Rajeswari, A. Venugopal // *Pharmacology online*. — 2010. — Vol. 1. — P. 537-541.

318. Rasmusson, A. M. An Increased Capacity for Adrenal DHEA Release is Associated with Decreased Avoidance and Negative Mood Symptoms in Women with PTSD / A. M. Rasmusson, J. Vasek, D. S. Lipschitz, D. Vojvoda, M. E. Mustone, Q. Shi, G. Gudmundsen // *Neuropsychopharmacology*. — 2004. — Vol. 29, № 8. — P. 1546–1557.

319. Reimold, M. Central serotonin transporter levels are associated with stress hormone response and anxiety / M. Reimold, A. Knobel, M. A. Rapp, A. Batra, K. Wiedemann, A. Ströhle, A. Zimmer // *Psychopharmacology*. — 2010. — Vol. 213, № 2–3. — P. 563–572.

320. Riaza Bermudo-Soriano, C. New perspectives in glutamate and anxiety / C. R. Bermudo-Soriano, M. M. Perez-Rodriguez // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. — 2012. — Vol. 100, № 4. — P. 752–774.

321. Rossano, R. What are the proteolytic enzymes of honey and what they do tell us? A fingerprint analysis by 2-D zymography of Unifloral Honeys / R. Rossano, M. Larocca, T. Polito, A. M. Perna, M. C. Padula, G. Martelli, P. Riccio // *PLoS ONE*. — 2012. — Vol. 7, № 11.

322. Rutka, I. Bee drone brood homogenate chemical composition and application: a review / I. Rutka, R. Galoburda, J. Galins, A. Galins // *Research for Rural Development*. — 2021. — Vol. 36. — P. 96-103.

323. Ryan, M. J. ACE, ACE Inhibitors, and Other JNK / M. J. Ryan, C. D. Sigmund // *Circulation Research*. — 2004. — Vol. 94, № 1. — P. 1–3.

324. Saavedra, J. M. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress / J. M. Saavedra, J. Benicky // *Stress*. — 2007. — Vol. 10, № 2. — P. 185–193.

325. Sajdyk, T. Chronic inhibition of GABA synthesis in the bed nucleus of the stria terminalis elicits anxiety-like behavior / T. J. Sajdyk, P. L. Johnson, S. D. Fitz, A. Shekhar // *Journal of Psychopharmacology*. — 2008. — Vol. 22, № 6. — P. 633–641.

326. Sak-Bosnar, M. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey / M. Sak-Bosnar, N. Sakač // *Food Chemistry*. — 2012. — Vol. 135, № 2. — P. 827–831.

327. Santabárbara, J. Prevalence of anxiety in the COVID-19 pandemic: An updated

meta-analysis of community-based studies / J. Santabárbara, I. Lasheras, D. M. Lipnicki // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. — 2021. — Vol. 109. — P. 110207.

328. Sawczuk, R. What do we need to know about drone brood homogenate and what is known / R. Sawczuk, J. Karpinska, W. Milyk // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2019. — Vol. 245. — 111581.

329. Schalla, M. A. Central blockage of nesfatin-1 has anxiolytic effects but does not prevent corticotropin-releasing factor-induced anxiety in male rats / M. A. Schalla, S. G. Kühne, T. Friedrich, P. Kobelt // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2020. — Vol. 529, № 3. — P. 773–777.

330. Schüle, C. The role of allopregnanolone in depression and anxiety / C. Schüle, C. Nothdurfter, R. Rupprecht // *Progress in Neurobiology*. — 2014. — Vol. 113. — P. 79–87.

331. Schumacher, M. Neurosteroids / M. Schumacher, P. Robel, E.-E. Baulieu // *Encyclopedia of Neuroscience*. — Elsevier, 2009. — P. 1015–1020.

332. Šedivá, M. 10-HDA, A Major Fatty Acid of Royal Jelly, Exhibits pH Dependent Growth-Inhibitory Activity Against Different Strains of *Paenibacillus* larvae / M. Šedivá, M. Laho, L. Kohútová, A. Mojžišová, J. Majtán, J. Klaudivy // *Molecules*. — 2018. — Vol. 23, № 12. — 3236.

333. Seraglio, S. K. Quality, composition and health-protective properties of Citrus Honey: A Review / S. K. T Seraglio, M. Schulz, P. Brugnerotto, B. Silva // *Food Research International*. — 2021. — Vol. 143. — 110268.

334. Seres, A. B. Androgenic effect of honeybee drone milk in castrated rats: Roles of methyl palmitate and methyl oleate / A. B. Seres, E. Ducza, M. Báthori, A. Hunyadi // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2014. — Vol. 153, № 2. — P. 446–453.

335. Seres, A. B. Investigation of gestagenic effect of raw drone milk in rats / A. Seres, E. Ducza, R. Gáspár // *Acta Pharmaceutica Hungarica*. — 2014. — Vol. 84, №2. — P. 77–81.

336. Sharma, M. A Recent Update on Intranasal Delivery of High Molecular Weight Proteins, Peptides, and Hormones / M. Sharma, S. Waghela, R. Mhatre, G. K. Saraogi // *Cur-*

rent Pharmaceutical Design. — 2021. — Vol. 27, № 42. — P. 4279–4299.

337. Shen, L. Expression of Acc-Royalisin Gene from Royal Jelly of Chinese Honeybee in *Escherichia coli* and Its Antibacterial Activity / L. Shen, M. Ding, L. Zhang, F. Jin // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2010. — Vol. 58, № 4. — P. 2266–2273.

338. Sherlock, O. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* / O. Sherlock, A. Dolan, R. Athman, A. Power, G. Gethin, S. Cowman, H. Humphreys // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. — 2010. — Vol. 10, № 1.

339. Shi, X. Sulfur dioxide derivatives produce antidepressant- and anxiolytic-like effects in mice / X. Shi, Y. Gao, L. Song, P. Zhao, Y. Zhang, Y. Ding // *Neuropharmacology*. — 2020. — Vol. 176. — 108252.

340. Shim, H. S. Role of astrocytic GABAergic system on inflammatory cytokine-induced anxiety-like behavior / H. S. Shim, H. J. Park, J. Woo, C. J. Lee, I. Shim // *Neuropharmacology*. — 2019. — Vol. 160. — 107776.

341. Shimazaki, T., Melanin-Concentrating Hormone MCH1 Receptor Antagonists / T. Shimazaki, T. Yoshimizu, S. Chaki // *CNS Drugs*. — 2006. — Vol. 20, № 10. — P. 801–811.

342. Shonesy, B. C. Genetic Disruption of 2-Arachidonoylglycerol Synthesis Reveals a Key Role for Endocannabinoid Signaling in Anxiety Modulation / B. C. Shonesy, R. J. Bluett, T. S. Ramikie, R. Baldi, D. J. Hermanson, P. J. Kingsley, L. J. Marnett // *Cell Reports*. — 2014. — Vol. 9, № 5. — P. 1644–1653.

343. Shorter, J. R. The Effects of Royal Jelly on Fitness Traits and Gene Expression in *Drosophila melanogaster* / J. R. Shorter, M. Geisz, E. Özsoy, M. M. Magwire, M. A. Carbone, T. F. C Mackay // *PLoS ONE*. — 2015. — Vol. 10, № 7. — e0134612.

344. Sidor, E. Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development / E. Sidor, M. Miłek, M. Tomczyk, M. Dżugan // *Antioxidants*. — 2021. — Vol. 10, № 5. — P. 639.

345. Sidor, E. Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach / E. Sidor, M. Dżugan // *Molecules*. — 2020.

— Vol. 25, № 23. — P. 5699.

346. Sidor, E. Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication / E. Sidor, M. Milek, G. Zaguła, A. Bocian, M. Dżugan // *Foods*. — 2021. — Vol. 10, № 9. — 2233.

347. Singh, D. K. Spectrophotometric determination of corticosteroids and its application in pharmaceutical formulation / D. K. Singh, R. Verma. — 2008.

348. Sintayehu, B. Physico-chemical properties of Ethiopian *apis mellifera* honey: Review / S. Berhanu, D. M. Tadesse, A. Jorge // *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*. — 2022. — Vol. 8, № 1. — P. 38–44.

349. Skeggs, L. T. Jr. The existence of two form of hypertensin / L. T. Skeggs Jr, W. H. Marsh, J. R. Kahn // *Journal of Experimental Medicine*. — 1954. — Vol. 99, № 3. — P. 275–282.

350. Socała, K. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders / K. Socała, U. Doboszevska, A. Szopa, A. Serefko // *Pharmacological Research*. — 2021. — Vol. 172. — 105840.

351. Sommer, W. Local 5,7-Dihydroxytryptamine Lesions of Rat Amygdala Release of Punished Drinking, Unaffected Plus-Maze Behavior and Ethanol Consumption / W. Sommer // *Neuropsychopharmacology*. — 2001. — Vol. 24, № 4. — P. 430–440.

352. Spanidi, E. Royal Jelly Components Encapsulation in a Controlled Release System —Skin Functionality, and Biochemical Activity for Skin Applications / E. Spanidi, S. Athanasopoulou, A. Liakopoulou, A. Chaidou, S. Hatziantoniou, K. Gardikis // *Pharmaceuticals*. — 2022. — Vol. 15, № 8. — P. 907.

353. Spyroulias, G. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases / G. A. Spyroulias, A. S. Galanis, G. Pairas, E. Manessi-Zoupa, P. Cordopatis // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. — 2004. — Vol. 4, № 4. — P. 403–429.

354. Stein, D. J. Serotonin and anxiety: current models / D. J. Stein, S. Stahl // *International Clinical Psychopharmacology*. — 2000. — Vol. 15. — P. S1–S6.

355. Strittmatter, S. M. A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme. Unique

specificity for amidated peptide substrates / S. M. Strittmatter, E. A. Thiele, M. S. Kapiloff // *Journal of Biological Chemistry*. — 1985. — Vol. 260, № 17. — P. 9825-9832.

356. 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.

357. Sturrock, E. D. What's new in the renin-angiotensin system? / E. D. Sturrock, R. Natesh, J. M. van Rooyen, K. R. Acharya // *Cellular and Molecular Life Sciences* — 2004. — Vol. 61, № 21. — P. 2677–2686.

358. Sudakov, S. K. Differences in genetic predisposition to high anxiety in two inbred rat strains: role of substance P, diazepam binding inhibitor fragment and neuropeptide Y / S. K. Sudakov, O. F. Medvedeva, I. V. Rusakova, N. N. Terebilina, S. R. Goldberg // *Psychopharmacology*. — 2001. — Vol. 154, № 4. — P. 327–335.

359. Sun, Y. Norepinephrine and Corticotropin-Releasing Hormone: Partners in the Neural Circuits that Underpin Stress and Anxiety / Y. Sun, S. Hunt, P. Sah // *Neuron*. — 2015. — Vol. 87, № 3. — P. 468–470.

360. Taïbi, N. Multifloral white honey outclasses manuka honey in methylglyoxal content: assessment of free and encapsulated methylglyoxal and anti-microbial peptides in liposomal formulation against toxigenic potential of *Bacillus subtilis* Subsp *spizizenii* strain / N. Taïbi, R. Ameraoui, A. Kaced, M. Abou-Mustapha, A. Bouchama, A. Djafri, A. Taïbi, K. Mellahi // *Food & Function*. — 2022. — Vol. 13, № 14. — P. 7591–7613.

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

362. Tanaka, M. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies / M. Tanaka, M. Yoshida, H. Emoto, H. Ishii // *European Journal of Pharmacology*. — 2000. Vol. 405, № 1–3. — P. 397–406.

363. Tasan, R. O. Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety / R. O. Tasan, A. Bukovac, Y. N. Peterschmitt, S. B. Sartori // *Neuroscience*. — 2011. — Vol. 183. — P. 71–80.

364. Taskiran, D. Effect of Carbon Monoxide on Dopamine and Glutamate Uptake and

cGMP Levels in Rat Brain / D. Taskiran, F. Z. Kutay, S. Pogun // *Neuropsychopharmacology*. — 2002. — Vol. 28, № 6. — P. 1176–1181.

365. Tillmann, S. Sustained overexpression of neuropeptide S in the amygdala reduces anxiety-like behavior in rats / S. Tillmann, H. E. Skibdal, S. H. Christiansen // *Behavioural Brain Research*. — 2019. — Vol. 367. — P. 28–34.

366. Todorovic, C. 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.

367. Tramuta, C. Antibacterial activities of Manuka and Honeydew honey-based membranes against bacteria that cause wound infections in animals / C. Tramuta, P. Nebbia, P. Robino, G. Giusto, M. Gandini, S. Chiado-Cutin, E. Grego // *Schweiz Arch Tierheilkd*. — 2017. — Vol. 159, № 2. — P. 117–121.

368. Trieu, B. H. Angiotensin-converting enzyme gates brain circuit-specific plasticity via an endogenous opioid / B. H. Trieu, B. C. Remmers, C. Toddes, D. D. Brandner, E. M. Lefevre, A. Kocharian, C. L. Retzlaff // *Science*. — 2022. — Vol. 375, № 6585. — P. 1177–1182.

369. Tsuji M. Multiplicity of anxiety and serotonin nervous system / M. Tsuji, H. Takeda, T. Matsumiya // *Folia Pharmacologica Japonica*. — 2000. — Vol. 115, № 1. — P. 29–38.

370. Tu, W. Serotonin in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behavior during amphetamine withdrawal / W. Tu, A. Cook, J. L. Scholl, M. Mears, M. J. Watt, K. J. Renner // *Neuroscience*. — 2014. — Vol. 281. — P. 35–43.

371. Uthaibutra, V. Inhibition of Skin Pathogenic Bacteria, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Royal Jelly from Northern Thailand / V. Uthaibutra, T. Kaewkod, P. Prapawilai, H. Pandith, Y. Tragoolpua // *Molecules*. — 2023.— Vol. 28, № 3. — P. 996.

372. Vasilenko, Yu. K. Biological Effect of Drone Brood under Chronic Hyperlipidemia Conditions / Y. K. Vasilenko, O. V. Klimova, D. S. Lazaryan // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. — 2002. — Vol. 36, № 8. — P. 434–436.

373. Verma, A. Carbon Monoxide: a Putative Neural Messenger / A. Verma, D. J. Hirsch, C. E. Glatt, G. V. Ronnett, S. H. Snyder // *Science*. — 1993. — Vol. 259, № 5093. — P.

381–384.

374. Wan, D. C. Honey bee Royalactin unlocks conserved pluripotency pathway in mammals / D. C. Wan, S. L. Morgan, A. L. Spencley, N. Mariano, E. Y. Chang, G. Shankar, Y. Luo, T. H. Li, D. Huh // *Nature Communications*. — 2018. — Vol. 9, № 1. — 5078.

375. Wang, J. Chemical composition, characterization, and differentiation of Honey Botanical and geographical origins / J. Wang, Q. X. Li // *Advances in Food and Nutrition Research*. — 2011. — Vol. 62. — P. 89–137.

376. Wang, W. Effects of Major Royal Jelly Proteins on the Immune Response and Gut Microbiota Composition in Cyclophosphamide-Treated Mice / W. Wang, X. Li, D. Li, F. Pan, X. Fang, W. Peng, W. Tian // *Nutrients*. — 2023. — Vol. 15, № 4. — P. 974.

377. Wang, W. Pinocembrin mitigates depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress through ameliorating neuroinflammation and apoptosis / W. Wang, L. Zheng, L. Xu, J. Tu, X. Gu // *Molecular Medicine*. — 2020. — Vol. 26, № 1.

378. Wegener, G. Nitric Oxide Synthase Inhibitors as Antidepressants / G. Wegener, V. Volke // *Pharmaceuticals*. — 2010. — Vol. 3, № 1. — P. 273–299.

379. Weiser, M. Long-Term Administration of Queen Bee Acid (QBA) to Rodents Reduces Anxiety-Like Behavior, Promotes Neuronal Health and Improves Body Composition / M. J. Weiser, V. Grimshaw, K. M. Wynalda, M. H. Mohajeri, C. M. Butt // *Nutrients*. — 2017. — Vol. 10, № 1. — P. 13.

380. Wierońska, J. M. Glutamate-based anxiolytic ligands in clinical trials / J. M. Wierońska, A. Pilec // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. — 2013. — Vol. 22, № 8. — P. 1007–1022.

381. Willner, P. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant / P. Willner, A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous, R. Muscat // *Psychopharmacology*. — 1987. — Vol. 93, № 3. — P. 358–364.

382. Wise, T. Cholinergic Modulation of Disorder-Relevant Neural Circuits in Generalized Anxiety Disorder / T. Wise, F. Patrick, N. Meyer, N. Mazibuko, A. E. Oates // *Biological Psychiatry*. — 2020. — Vol. 87, № 10. — P. 908–915.

383. Wittmann, W. Prodynorphin-Derived Peptides Are Critical Modulators of Anxiety and Regulate Neurochemistry and Corticosterone / W. Wittmann, E. Schunk, I. Rosskothén,

- S. Gaburro, N. Singewald, H. Herzog, C. Schwarzer // *Neuropsychopharmacology*. — 2008. — Vol. 34, № 3. — P. 775–785.
- 384.** Won, S.-R. Immunological characterization of honey major protein and its Application / S. R. Won, C. Y. Li, J. W. Kim, H. I. Rhee // *Food Chemistry*. — 2009. — Vol. 113, № 4. — P. 1334–1338.
- 385.** World Health Organization. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022–2020 data. — 2022.
- 386.** Wu, M. Electroacupuncture Alleviates Anxiety-Like Behaviors Induced by Chronic Neuropathic Pain via Regulating Different Dopamine Receptors of the Basolateral Amygdala / M. Wu, Y. Chen, Z. Shen, Y. Zhu, S. Xiao, X. Zhu // *Molecular Neurobiology*. — 2022. — Vol. 59, № 9. — P. 5299–5311.
- 387.** Xi, Z.-X. Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice / Z. X. Xi, X. Q. Peng, X. Li, R. Song, H. Y. Zhang, Q. R. Liu // *Nature Neuroscience*. — 2011. — Vol. 14, № 9. — P. 1160–1166.
- 388.** Yang, Y.-C. 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells / Y. C. Yang, W. M. Chou, D. A. Widowati, I. P. Lin // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. — 2018. — Vol. 18, № 1.
- 389.** Yasui, Y. Amygdaloid axon terminals are in contact with trigeminal premotor neurons in the parvicellular reticular formation of the rat medulla oblongata / Y. Yasui, T. Tsumori, T. Oka, S. Yokota // *Brain Research*. — 2004. — Vol. 1016, № 1. — P. 129–134.
- 390.** Yin, A. Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression / A. Yin, F. Wang, X. Zhang // *Acta Pharmacologica Sinica*. — 2018. — Vol. 40, № 3. — P. 336–341.
- 391.** Yorgason, J. T. Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats / J. T. Yorgason, R. A. España, J. K. Konstantopoulos, J. L. Weiner, S. R. Jones // *European Journal of Neuroscience*. — 2013. — Vol. 37, № 6. — P. 1022–1031.
- 392.** Yu, F. Royal Jelly Proteome Comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana* / F. Yu, F. Mao, L. Jianke // *Journal of Proteome Research*. — 2010. — Vol. 9,

№ 5. — P. 2207–2215.

393. Yu, X.-D. Distinct serotonergic pathways to the amygdala underlie separate behavioral features of anxiety / X. D. Yu, Y. Zhu, Q. X. Sun, F. Deng, J. Wan, D. Zheng, W. Gong, S. Z. Xie, C. J. Shen, J. Y. Fu, H. Huang // *Nature Neuroscience*. — 2022. — Vol. 25, № 12. — P. 1651–1663.

394. Zahir, F. The Gut–Brain Axis, Cognition and Honey / F. Zahir, S. S. Alhewairini, M. Mahamood // *Therapeutic Applications of Honey and its Phytochemicals*. — 2020. — Vol. 1. — P. 331–343.

395. Zahoor, M. Antibacterial, antifungal and antioxidant activities of honey collected from Timergara (Dir, Pakistan) / M. Zahoor, S. Naz, M. Sangeen // *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. — 2014. — Vol. 27, №1. — P. 45–50.

396. Zemanova, M. Excellent antibacterial activity of Slovak honeys on bacteria mostly infecting chronic wounds / M. Zemanová, L. Slobodníková, M. Cambal, P. Labas // *Bratislava Medical Journal*. — 2021. — Vol. 122, № 07. — P. 519–525.

397. Zhan, Y. Effects of glutamate-related drugs on anxiety and compulsive behavior in rats with obsessive-compulsive disorder / Y. Zhan, J. Xia, X. Wang // *International Journal of Neuroscience*. — 2019. — Vol. 130, № 6. — P. 551–560.

398. Zhang, C. Catalytic Mechanism of Angiotensin-Converting Enzyme and Effects of the Chloride Ion / C. Zhang, S. Wu, D. Xu // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2013. — Vol. 117, № 22. — P. 6635–6645.

399. Zhang, F. Comparison of topical honey and povidone iodine-based dressings for wound healing: a systematic review and meta-analysis / F. Zhang, Z. Chen, F. Su, T. Zhang // *Journal of Wound Care*. — 2021. — Vol. 30, № Sup4. — P. S28–S36.

400. Zhang, H. Regulation of dopamine transporter activity by carboxypeptidase E / H. Zhang, S. Li, M. Wang, B. Vukusic, Z. B. Pristupa, F. Liu // *Molecular Brain*. — 2009. Vol. 2, № 1. — 10(2009)

401. Zhang, M. Anxiolytic effects of hippocampal neurosteroids in normal and neuropathic rats with spared nerve injury / M. Zhang, J. Liu, M. M. Zhou, H. Wu, Y. Hou, Y. F. Li, Y. Yin, L. Zheng, J. Cai, F. F. Liao, F. Y. Liu, M. Yi // *Journal of Neurochemistry*. — 2017. — Vol. 141, № 1. — P. 137–150.

402. Zhang, Q. Preparation of aloe polysaccharide/honey/PVA composite hydrogel: Antibacterial activity and promoting wound healing / Q. Zhang, M. Zhang, T. Wang, X. Chen, Q. Li // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2022. — Vol. 211. — P. 249–258.
403. Zhang, X. NG2 glia-derived GABA release tunes inhibitory synapses and contributes to stress-induced anxiety / X. Zhang, Y. Liu, X. Hong, X. Li, C. K. Meshul, C. Moore, Y. Yang, Y. Han, W. G. Li, X. Qi, H. Lou // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12, № 1.
404. Zhou, E. Effects of Bee Pollen Derived from *Acer mono Maxim.* or *Phellodendron amurense Rupr.* on the Lipid Composition of Royal Jelly Secreted by Honeybees / E. Zhou, Q. Wang, X. Li, D. Zhu, Q. Niu, Q. Li, L. Wu // *Foods*. — 2023. — Vol. 12, № 3. — P. 625.
405. Zhou, J. An optimized analog of antimicrobial peptide Jelleine-1 shows enhanced antimicrobial activity against multidrug resistant *P. aeruginosa* and negligible toxicity in vitro and in vivo / J. Zhou, L. Zhang, Y. He, K. Liu, F. Zhang, H. Zhang // *European Journal of Medicinal Chemistry*. — 2021. — Vol. 219. — P. 113433.
406. Zhu, L. nNOS-CAPON blockers produce anxiolytic effects by promoting synaptogenesis in chronic stress-induced animal models of anxiety / L. J. Zhu, H. J. Shi, L. Chang, C. C. Zhang, M. Si, N. Li, D. Y. Zhu // *British Journal of Pharmacology*. — 2020. — Vol. 177, № 16. — P. 3674–3690.
407. Zhu, X. Carboxypeptidase E is required for normal synaptic transmission from photoreceptors to the inner retina / X. Zhu, K. Wu, L. Rife, N. X. Cawley, B. Brown, T. Adams, K. Teofilo, C. Lillo, D. S. Williams, Y. P. Loh // *Journal of Neurochemistry*. — 2005. — Vol. 95, № 5. — P. 1351–1362.
408. Zorumski, C. F. Neurosteroids as novel antidepressants and anxiolytics: GABA-A receptors and beyond / C. F. Zorumski, S. M. Paul, D. F. Covey, S. Mennerick // *Neurobiology of Stress*. — 2019. — Vol. 11. — 100196.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2-AG — 2-арахидоноилглицерол
3'-UTR — 3'-нетранслируемый регион
5-НТТ — 5-гидрокситриптамин
5HT1A — рецепторы к серотонину 1A-типа
АГВ-агар — агар Гивенталья-Ведьминой
АКТГ — адренкортикотропный гормон
АМП — антимикробный пептид
АСТ — аспаргатминотрансфераза
АТФ — аденозинтрифосфат
АФК — активная форма кислорода
БАД — биологически активная добавка
ВИП — вазоактивный инестинальный пептид
ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спек-
трометрия
ГАМК — гамма-аминомасляная кислота
ГГНО — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось
ДЭАЭ-целлюлоза — диэтиламиноэтил целлюлоза
ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
ИФА — иммуноферментный анализ
КПЕ — карбоксипептидаза E
ЛПС — липополисахарид
МДМА — метилендиоксиметамфетамин
МКБ-11 — международная классификация болезней 11-й версии
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота
МСГ — меланоцитостимулирующий гормон
ОКМ — ось «мозг-кишечник»

ОКР — обсессивно-компульсивное расстройство

ПААГ — полиакриламидный гель

ПАВ — психоактивное вещество

ПДПА — пептидил-дипептидаза А

ПНС — периферическая нервная система

ПОМК — проопиомеланокортин

ПТСР — посттравматическое стрессовое расстройство

цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС — центральная нервная система

AcSDKP — N-ацетил-серил-аспартил-лизил-пролин

AMPA — рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой

кислоты

BDV-синдром — синдром Блейкмора-Дурмаза-Василю

CART — кокаин-амфетамин-регулируемого транскрипт

CB1R, CB2R — рецепторы каннабиноидов 1 и 2 типов

ССК — холецистокинин

COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года

CRHR1 — рецептор кортиколиберина 1 типа

DRD1, DRD2 — рецепторы дофамина 1 и 2 типов

FAD — флавинадениндинуклеотид

FDA — Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарствен-

ных средств

GAD — глутаматдекарбоксилаза

GBBR1, GBBR2 — 1 и 2 субъединицы ГАМК_B-рецепторов

GEMSA — гуанидиноэтилмеркаптоянтарная кислота

MAPK — митоген-активируемая протеинкиназа

mGluR2, mGluR3, mGluR8 — рецепторы глутамата 2, 3 и 8 типов

MRJP — главный белок маточного молочка

MRSA — метицилин-устойчивый золотистый стафилококк

NADA — N-арахидонил-дофамин

NMDA — N-метил-D-аспаратат

NMDAR — рецепторы NMDA

nNO — нейрональный оксид азота

NPY — нейропептид Y

proSAAS — предшественник ингибитора конвертазы субтилизина/кексина 1

типа

SDS — додецилсульфат натрия

SNP — однонуклеотидный полиморфизм

UDP — уридиндифосфат

VGLUT3 — везикулярный переносчик глутамата 3 типа

VNAB — вентральные норадреналиновые пучки